

## **Liquid Biopsie aus Plasma für ein minimal-invasives Monitoring von Kopf-Hals-Karzinompatienten**

Anne-Kathrin Klews

Vollständiger Abdruck der von der TUM School of Medicine and Health der Technischen  
Universität München zur Erlangung einer

Doktorin der Zahnheilkunde (Dr. med. dent.)

genehmigten Dissertation.

Vorsitz: Prof. Dr. Ernst J. Rummeny

Prüfer\*innen der Dissertation:

1. Priv.-Doz. Dr. Dr. Markus Nieberler
2. Prof. Dr. Herbert Deppe

Die Dissertation wurde am 19.05.2023 bei der Technischen Universität München eingereicht  
und durch die TUM School of Medicine and Health am 14.11.2023 angenommen.

# Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis .....	I	
Abkürzungsverzeichnis .....	V	
<b>1</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
1.1	ALLGEMEINES .....	1
1.2	DAS MUNDHÖLENKARZINOM.....	3
1.2.1	Epidemiologie.....	3
1.2.2	Ätiologie .....	4
1.2.3	Klinik.....	5
1.2.4	Diagnostik.....	7
1.2.4.1	Bildgebung .....	8
1.2.4.2	Stadieneinteilung und TNM-Klassifikation .....	9
1.2.4.3	Grading .....	13
1.2.5	Therapie.....	14
1.2.5.1	Chirurgische Verfahren .....	15
1.2.5.2	Strahlentherapie .....	21
1.2.5.3	Radiochemotherapie .....	23
1.2.5.4	Palliativtherapie.....	25
1.2.5.5	Rezidivtherapie.....	27
1.2.6	Prognose .....	28
1.3	TUMORWACHSTUM UND METASTASIERUNG.....	29
1.4	EPITHELIAL-MESENCHYMALE TRANSITION .....	32
1.5	ZIRKULIERENDE TUMORZELLEN.....	35
1.6	INTEGRIN AV $\beta$ 6 ALS IM BLUT ZIRKULIERENDER TUMORMARKER.....	37
1.7	ZIEL DIESER ARBEIT UND FRAGESTELLUNG .....	39
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>40</b>
2.1	MATERIAL .....	40
2.1.1	Verbrauchsmaterial.....	40
2.1.2	Geräte .....	41
2.1.3	Kommerzielle Kits.....	41

---

2.2	METHODEN.....	42
2.2.1	Patientenkollektiv .....	42
2.2.2	Probengewinnung .....	43
2.2.3	Isolation von Gesamt-RNA aus Zellen des Buffy-Coats .....	44
2.2.3.1	Grundlagen der RNA-Isolierung .....	44
2.2.3.2	Säulenchromatographie .....	45
2.2.3.3	Ribonukleasen .....	46
2.2.3.4	Durchführung der RNA-Isolierung mit Rneasy® Protect Mini Kit.....	47
2.2.3.5	Photometrische Messung des RNA-Gehalts .....	50
2.2.4	Umschreibung der isolierten RNA in cDNA.....	51
2.2.4.1	Grundlagen der cDNA-Umschreibung.....	51
2.2.4.2	Durchführung der cDNA-Umschreibung mit SuperScript™ First-Strand Synthesis System für RT-PCR .....	51
2.2.5	Polymerase Kettenreaktion.....	54
2.2.5.1	Grundlagen der Polymerase Kettenreaktion (PCR) .....	54
2.2.5.2	Weiterentwicklung zur quantitativen Real-Time-RT-PCR: Umstellen der PCR auf SYBR Green und Real Time .....	56
2.2.5.3	Relative Quantifizierung .....	57
2.2.5.4	Herstellung von Standards.....	58
2.2.5.5	Durchführung qRT-PCR mit LightCycler® 1.0 Real-Time Detection System .....	59
2.2.6	Statistische Auswertung .....	61
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>62</b>
3.1	DATEN DER ERKRANKTEN PERSONEN.....	62
3.1.1	Geschlecht der erkrankten Personen .....	62
3.1.2	Alter der erkrankten Personen .....	62
3.2	HÄUFIGKEITEN DER KATEGORIALEN VARIABLEN.....	66
3.2.1	Tumor .....	67
3.2.2	Nodal-Status .....	68
3.2.3	Grading .....	69
3.2.4	Resektionsrand .....	70
3.3	EXPRESSIONSANALYSE DER $\beta$ 6-MRNA .....	72
3.3.1	Definition der Expression der $\beta$ 6-mRNA.....	72
3.3.2	Darstellung der Einzelmesswerte der Expression von $\beta$ 6-mRNA .....	73

3.3.3	Deskriptive Werte zur Expression der $\beta 6$ -mRNA.....	75
3.3.4	Darstellung der Expression von $\beta 6$ -mRNA als Boxplot-Diagramm.....	76
3.3.5	Graphische Darstellung des Medians der Expression von $\beta 6$ -mRNA.....	77
3.4	INDUKTIVE AUSWERTUNGEN.....	77
3.4.1	Unterschiede beim Expressionslevel von $\beta 6$ -mRNA zwischen den Gruppen ...	78
3.4.2	Altersunterschied zwischen den Gruppen .....	79
3.4.3	Ergebnisse der Korrelationen .....	81
3.4.3.1	Deskriptive Darstellung der Faktorstufen .....	81
3.4.4	Korrelation zwischen Expression von $\beta 6$ -mRNA und Faktorstufen (AJCC-Code, T, N, G).....	83
3.4.4.1	Korrelation zwischen Expression von $\beta 6$ -mRNA und dem Zustand des Resektionsrands.....	84
3.4.4.2	Korrelation zwischen Expression von $\beta 6$ -mRNA und Alter.....	85
<b>4</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>87</b>
4.1	KOLLEKTIV DER ERKRANKTEN PERSONEN.....	87
4.1.1	Geschlecht der erkrankten Personen .....	87
4.1.2	Alter der erkrankten Personen .....	88
4.2	TUMOR UND METASTASEN .....	90
4.2.1	Staging.....	90
4.3	ZIRKULIERENDE TUMORINTEGRINE IN DER KARZINOMDIAGNOSTIK.....	92
4.3.1	Stellenwert der Methode im klinischen Kontext .....	92
4.3.1.1	Bedeutung der zirkulierenden Tumorgene für die erkrankten Personen.....	95
4.3.1.2	Zirkulierende Tumorgene als diagnostisches Mittel für die behandelnde Person .....	96
4.3.1.3	Bedeutung der zirkulierenden Tumorgene für die Klinik .....	97
4.4	METHODE UND TECHNIK .....	98
4.4.1	Kritische Aspekte bei der Probengewinnung und -aufbereitung.....	98
4.4.1.1	Blutentnahme.....	98
4.4.1.2	Gewinnung des Buffy-Coats .....	99
4.4.1.3	RNA-Isolierung .....	99
4.4.1.4	Photometrische Messung.....	100
4.4.1.5	cDNA-Synthese.....	100
4.4.1.6	PCR.....	101

---

4.4.1.7	Auswahl der erkrankten und gesunden Studienteilnehmenden.....	103
4.5	BEURTEILUNG DER EXTREMEN MESSABWEICHUNGEN.....	104
4.5.1	Beurteilung der extremen Messabweichungen bei erkrankten Teilnehmenden .....	104
4.5.2	Beurteilung der extremen Messabweichungen bei gesunden Teilnehmenden.	105
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>106</b>
<b>6</b>	<b>SUMMARY.....</b>	<b>108</b>
	Literaturverzeichnis .....	110
	Abbildungsverzeichnis .....	i
	Tabellenverzeichnis .....	ii
	Anhang.....	iv
	Danksagung .....	ix
	Veröffentlichung.....	x
	Lebenslauf .....	xi
	Eidesstattliche Erklärung.....	xii

## Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm, µM	Mikrometer
AJCC	American Joint Committee on Cancer
cDNA	Complementary Desoxyribonucleic Acid
CAMs	Cell Adhesion Molecules
Cis	Carcinoma in situ
Ct	Cycle Threshold
CT	Computertomographie
CTC	Circulating Tumor Cells
ctDNA	Circulating tumor DNA
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonucleic Acid
dNTP	DeoxyribonucleotideTriphosphat
dsDNA	Doppelsträngige DNA
dT	Deoxythymine
DTT	1,4-Dithiothreitol
ECE	Extracapsular Extension
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
EMT	Epithelial-Mesenchymale Transition
ENE	Extranodal extension
ERK	Extrazellulär regulierte Kinase
ERND	Erweiterte Radikale Neck-Dissection
etc	Et cetera
EtOH	Ethanol
EZM	Extrazelluläre Matrix
FAK	Focal Adhesion Kinase
FDG	Fluorodesoxyglucose
FOXC2	Forkhead-Box-Protein C2
FU	Fluoruracil
G	Grading
GAPDH	Glycerinaldehy-3-phosphat-Dehydrogenase
Gy	Gray
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HNO	Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde
HPV	Humanes Papilloma-Virus
IMRT	Intensitätsmodulierte Radiotherapie
ITG B6	Integrin αvβ6
kD	kilo-Dalton
KRT19	Cytokeratin-19
L	Lymphgefäße

---

LEF	Lymphocyte enhancer-binding factor
M	Metastase
MAPK	Mitogenaktivierte Proteinkinase
MET	Mesenchymal-epithelial transition
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
MiRNAs	Micro-RNAs
MKG	Mund-Kiefer-und Gesichtschirurgie
ml	Milliliter
mm	Millimeter
MM	Master-Mix
MMP	Matrix-Metalloproteinase
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
MRND	Modifiziert Radikale Neck-Dissection
MRT	Magnetresonanztomographie
N	Nodus, Grundgesamtheit
ng	Nanogramm
NTC	No Template Control
OPG	Orthopantomogramm
p	Probabilitas
P38 MAPK	P38-mitogenaktivierte Proteinkinasen
PBS	Phosphate-Buffered Saline
PEG	Perkutane endoskopische Gastrostomie
PET	Positronen Emissions -Tomographie
PFS	Progression-Free Survival
PI3K	Phosphoinositid 3-Kinase
Pn	Perineurale Invasion
Poly-(A)-RNA	Polyadenylated RNA
r	Korrelationskoeffizient
R	Residualtumor
Ras	Rat sarcoma
RhoA	Ras homolog family member A
RhoB	Ras homolog family member B
RNA	Ribonucleic Acid
RND	Radikale Neck-Dissection
rpm	Revolutions Per Minute
rRNA	Ribosomale Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
SCM	Musculus Sternocleidomastoideus
SD	Standard Deviation
Sig	Signifikanz
SIN	Squamöse Intraepitheliale Neoplasie
SND	Selektive Neck-Dissection
T	Tumor
TAQ-Polymerase	Thermus aquaticus Polymerase
TE	Tris-EDTA

---

TGF- $\beta$	Transforming Growth Factor Beta
SNAI/1	Snail Family Transcriptional Repressor 1
TNM	Primärtumor (T), Lymphknoten (N), Metastasen (M)
tRNA	Transfer-Ribonukleinsäure
UICC	Union International Contre Le Cancer
uPA	Plasminogenaktivator Urokinase
UV	Ultraviolett
V	Veneninvasion, Volt
VIM	Vimentin
WHO	World Health Organization



# 1 Einleitung

## 1.1 Allgemeines

Weltweit stellt das Mundhöhlenkarzinom eine der am häufigsten vorkommenden Krebserkrankungen dar. (Shah & Gil, 2009) Ungefähr 90 % der bösartigen Tumoren der Mundhöhle haben ihren Ursprung im Epithelgewebe und werden als orale Plattenepithelkarzinome klassifiziert. (Rivera 2015; Mascitti et al, 2018)

Die Prognose der an einem oralen Plattenepithelkarzinom erkrankten Personen ist trotz laufender Fortschritte in der Krebsprävention und im therapeutischen Vorgehen nach wie vor schlecht, was häufig in einem zu späten Diagnosezeitpunkt begründet liegt. (Rivera 2015; Mascitti et al, 2018) Die unveränderte Sterberate von 145 000 Erkrankten pro Jahr über das letzte Jahrzehnt bestätigt diesen Sachverhalt. (Gröbe et al, 2014; Panzarella et al, 2014; Rivera 2015)

Momentan stellen die klinische Untersuchung der Mundhöhle und die histologische Kontrolle des entnommenen suspekten Gewebes den Goldstandard in der Diagnostik des oralen Plattenepithelkarzinoms dar. (Fuller et al, 2015) Jedoch ist es das Ziel in der aktuellen Krebsforschung, weniger invasive und kostengünstigere Methoden zu finden, die die Krebserkrankung besser beurteilbar machen und eine Überwachung bezüglich des Tumorstadiums und therapeutischen Ansprechens ermöglichen. (Siravegna et al, 2017; Wang et al, 2017) In diesem Zusammenhang werden die Probeentnahme und die Analyse von nicht festem biologischem Gewebe wie Blut als gering invasive, ergänzende Diagnoseinstrumente in Betracht gezogen. (Dionne et al, 2015; Fuller et al, 2015; Aro et al, 2017)

Die Entstehung von Karzinomen wird durch DNA-Mutationen verursacht. (Stadler et al, 2010) Diesbezüglich ist bemerkenswert, dass Veränderungen der DNA sowohl in genetischen als auch in epigenetischen Strukturen durch Biomarker wie zirkulierende Tumorzellen (CTCs) oder zirkulierende Tumor-DNA (ctDNA) aufgezeigt werden können. Diese können in biologischen Flüssigkeiten wie Blut, Serum, Plasma, Pleuraflüssigkeit, Urin und Speichel gefunden werden. (Kaczor-Urbanowicz et al, 2017)

Der Vorteil in der Bewertung dieser Tumormarker aus einer Liquid-Biopsie liegt darin, dass zu mehreren Zeitpunkten ein Echtzeitbild des Tumors und seiner Metastasen generiert wird. Weiterhin werden dabei Informationen über die Belastung des Körpers durch den Tumor gewonnen und es können frühzeitig Hinweise auf eine Therapieresistenz oder ein Tumorrezidiv gegeben werden. (Di Meo et al, 2017)

Es konnte gezeigt werden, dass bei an einem oralen Plattenepithelkarzinom erkrankten Personen an der Invasionsfront zum umgebenden Weich- und Knochengewebe das epitheliale Protein  $\alpha\beta6$  in den Tumorzellen vermehrt exprimiert wird. (Nieberler et al, 2017) Dieses Integrin wird als Markerprotein der epithelial-mesenchymalen Transition (EMT) angesehen, der auch eine große Bedeutung bei der Aussaat der Tumorzellen ins Blutgefäßsystem zugeschrieben wird. (Thiery, 2002; Kalluri & Weinberg, 2009) In der vorliegenden Arbeit wird als Hypothese angenommen, dass  $\beta6$ -mRNA, die für die  $\beta6$ -Untereinheit des Integrin-Dimers  $\alpha\beta6$  kodiert, bei Personen mit oralem Plattenepithelkarzinom im Blutplasma in erhöhter Konzentration vorhanden ist. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurden Blutproben von 55 Personen mit der Diagnose eines oralen Plattenepithelkarzinoms auf das Vorhandensein der Expression der  $\beta6$ -mRNA analysiert und mit dem  $\beta6$ -mRNA-Expressionslevel in Blutproben von 33 gesunden Personen verglichen. Darüber hinaus wurde untersucht, ob ein Zusammenhang zwischen der Tumorausdehnung nach TNM-Klassifikation und dem Expressionslevel der mRNA der  $\beta6$ -Untereinheit im Blutplasma besteht.

Kriterien wie eine einfache Handhabung, möglichst niedrige Kosten, ein niedriger Invasionsgrad und eine geringe Beeinträchtigung der erkrankten Personen sind wesentliche Faktoren bei der Etablierung einer geeigneten Früherkennungsmethode. Da der Nachweis von im Blut zirkulierenden Tumormarkern als Screening-Methode diese Anforderungen erfüllt, scheint die Darstellung von mRNA der  $\beta6$ -Untereinheit des Integrin-Dimers  $\alpha\beta6$  im Plasma der Erkrankten eine aussichtsreiche Möglichkeit zu sein, um einen Tumor- und Verlaufparameter zu gewinnen.

## 1.2 Das Mundhöhlenkarzinom

### 1.2.1 Epidemiologie

Das orale Plattenepithelkarzinom ist ein bösartiger Tumor der Mund-Kiefer-Gesichts-Region mit einer hohen Inzidenzrate. In Deutschland beträgt die Anzahl der Neuerkrankten jährlich circa 10 000. (Wolff et al, 2021) Weltweit verzeichnet das orale Plattenepithelkarzinom eine jährliche Inzidenz von circa 600 000 und ist ursächlich für 1 bis 2 % der Todesfälle aller Krebserkrankungen. (Ferlay et al, 2015)

Karzinome des Rachens und der Mundhöhle stellen eine heterogene Gruppe maligner Neubildungen dar. Dabei finden sich zu etwa 90 % Plattenepithelkarzinome und daneben circa 5 % Adenokarzinome der Speicheldrüsen.

Ungefähr 5 % aller bösartigen Tumoren finden sich in der Mundhöhle mit den Regionen des Vestibulum oris, des nicht keratinisierten Lippenrots, der Innenwangen, des Alveolarfortsatzes, des retromolaren Dreiecks, der vorderen zwei Drittel der Zunge, des harten Gaumens, der Vorderfläche des weichen Gaumens und des Mundbodens.

Laut Angaben des Robert-Koch-Instituts haben sich seit dem Jahr 2000 die Inzidenz- und Mortalitätsraten für Malignome von Mundhöhle und Rachen nicht wesentlich verändert. (Kaatsch et al, 2013) Beim weiblichen Geschlecht ist hinsichtlich der Inzidenz eine leichte Zunahme zu verzeichnen, wobei Männer immer noch häufiger an einem oralen Plattenkarzinom erkranken. Unter allen malignen Tumorerkrankungen steht das Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle beim männlichen Geschlecht auf Platz 7. (Saarbrücken, 2006) Je nach Kultur und Geografie zeigen Erkrankungs- und Sterberaten der betroffenen Personen mit Mundhöhlenkarzinomen eine starke Variation. (Sankaranarayanan et al, 1998) Bemerkenswert sind die starken regionalen Unterschiede besonders bei Männern innerhalb Deutschlands: In Süddeutschland oder Schleswig-Holstein ist die Sterberate nur halb so hoch wie in Mecklenburg-Vorpommern.

Das mittlere Alter bei Erkrankung beträgt bei Frauen 62 und bei Männern 58 Jahre. Dass Männer durchschnittlich vier Jahre früher und insgesamt häufiger an malignen Mundhöhlenkarzinomen erkranken, ist mit deren häufigerem Tabak- und Alkoholkonsum assoziiert. (Saarbrücken, 2006; Lang et al, 2002)

### 1.2.2 Ätiologie

Bei den meisten Krebserkrankungen der Mundhöhle scheint die kanzerogene Wirkung auf die Mukosazellen und deren DNA zu über 60 % von äußeren Faktoren auszugehen. (Kadmani, 2007; Sankaranarayanan et al, 1998)

Tabak- und Alkoholkonsum sind die Risikofaktoren mit der größten Bedeutung für die Entstehung eines Mundhöhlenkarzinoms. Das Erkrankungsrisiko ist bei Rauchern gegenüber Nichtrauchern um ein Sechsfaches erhöht. Dabei ist anzumerken, dass die Kombination aus übermäßigem Alkoholkonsum und Rauchen das Risiko um den Faktor 30 erhöht. (Bagnardi et al, 2001; Talamini et al, 2002) Hochprozentiger Alkohol dient als Lösungsmittel für Kanzerogene, die im Rauch der Zigaretten enthalten sind. (Miller, 1974; Rodriguez et al, 2004; Vokes et al, 1993) Der orale Genuss von beispielsweise Kautabak stellt einen weiteren Risikofaktor dar. (Critchley et al, 2003) Ebenfalls ein begünstigender Faktor ist eine einseitige, vitaminarme Ernährung mit überdurchschnittlichem Fleischverzehr bei einem gleichzeitig geringen Verzehr von Gemüse und Obst. (Bosetti et al, 2002; Bosetti et al, 2003; Levi et al, 2000; Oreggia et al, 2001)

Auch eine mangelhafte Mundhygiene mit Plaques oder bakterieller Besiedlung und chronische mechanische Irritationen durch schlecht sitzenden Zahnersatz können die Entstehung eines Mundhöhlenkarzinoms fördern. (Schwenzer & Ehrenfeld, 2011)

Für Krebserkrankungen im Nasen-Rachen-Raum kann auch eine Beteiligung von Viren ursächlich sein; der Nachweis von humanem Papilloma-Virus (HPV) im Serum ist mit einem gesteigerten Risiko sowohl für das Mundhöhlen- als auch für das Pharynxkarzinom assoziiert. (Cruz et al, 2002; Dahlstrom et al, 2003; Herrero et al, 2003) In einschlägigen Studien konnte Hochrisiko-HPV-DNA in der Mundhöhle von an einem oralen Plattenepithelkarzinom erkrankten Personen mit einem Anteil zwischen 4 und 43 % nachgewiesen werden (Saraiya et al, 2015; Hübbers & Akgül 2015; Yete et al, 2018; Ndiaye et al, 2014). Es spielt vor allem der Hochrisiko-HP-Typ 16 eine zentrale Rolle. Hingegen wurden in oralen Plattenepithelkarzinomen nur selten andere Hochrisiko-Typen wie HPV18 festgestellt. (Syrjänen et al, 2011; Isayeva et al, 2012; Lingen et al, 2013)

Weiter können genetische Einflussfaktoren die Entstehung von oralen Plattenepithelkarzinomen begünstigen. Momentan existiert noch keine Screening-Methode, die den Nachweis dieser Risikofaktoren sichert. (Zheng Z et al, 2001; Elahi et al, 2002; Elahi et al, 2003; Cheng et al, 2002, Zheng Y et al, 2001)

Das Konzept der squamösen intraepithelialen Neoplasie (SIN) wird nach der World-Health-Organization-Einteilung der Kopf-Hals-Karzinome von 2005 auf Vorläuferläsionen des oralen Plattenepithelkarzinoms angewandt. Der SIN-Dysplasiegrad wird in niedrig, mäßig und hochgradig differenziert. (Macfarlane et al, 1992; Department of Dental Services Royal College England, 1994; Harris et al, 2016) Der veraltete Begriff *Karzinoma in situ* mit einem Entartungsrisiko von 90 % wurde in dieser Nomenklatur durch die Bezeichnung *hochgradige intraepitheliale Neoplasie* ersetzt. (Harris et al, 2016)

Leukoplakien können sich in ein Karzinom umwandeln. Unter leukoplaken Läsionen der Mundschleimhaut werden weißliche, nicht abwischbare Veränderungen verstanden, die kein anderes Geschehen als Ursache haben. (Axell, 2001; Van der Waal & Scully, 2011) Eine bestehende Leukoplakie sollte in regelmäßigen Abständen kontrolliert werden und es sollten gegebenenfalls Probenbiopsien zur histologischen oder zytologischen Untersuchung genommen werden, um bei hochgradig dysplastischen Veränderungen das betroffene Areal komplett zu entfernen.

### 1.2.3 Klinik

Wurde bei einer Person eine Läsion der Mundschleimhaut diagnostiziert, die nach zwei Wochen noch nicht abgeheilt ist, gilt dies grundsätzlich als verdächtig und jede haus- oder zahnärztliche Praxis sollte die direkte Überweisung der betroffenen Person zu einem Spezialisten zur weiteren Abklärung einleiten. Veränderungen der Mundschleimhaut mit Gewebeüberschuss oder -defekt, aber auch Verhärtungen mit Veränderungen der Kolorierung können auf die Anwesenheit eines Plattenepithelkarzinoms hinweisen. (Wolff et al, 2021) Beim oralen Plattenepithelkarzinom wird zwischen zwei Wachstumsmustern unterschieden: Das exophytische Wachstumsmuster zeichnet sich durch eine unregelmäßige und höckerige Oberflächenbeschaffenheit aus, hingegen spricht ein zentral gelegenes Ulkus mit einem marginalen Randwall für ein endophytisches Wachstum.

Zusätzlich können sich weißliche (leukoplakische) Auflagerungen zeigen, die häufig aus einer Keratinisierung resultieren. Oberflächliche Läsionen oder knötchenförmige Epithelverdickungen zeigen sich eher in einem initialen Stadium, während es in der späten Phase zu einer großflächigen Ausbreitung oder zu zapfenförmigem Tiefenwachstum kommen kann.

Besonders häufig betroffene Bereiche im Mund sind der Zungenrand (22 %) und der Mundboden (36 %), wobei sich 80 % der oralen Plattenepithelkarzinome im Unterkiefer finden und nur 5 % im Oberkieferbereich lokalisiert sind.

Ein orales Plattenepithelkarzinom kann sich klinisch unterschiedlich präsentieren; initial kann der beschriebene Befund von Zahnlockerungen oder Lymphknotenschwellungen im Halsbereich begleitet sein. Schreitet das Tumorwachstum voran, kann es zu funktionellen Einschränkungen wie Schluckbeschwerden, einer eingeschränkten Mundöffnung und Sprach- oder Kaustörungen kommen. Aus der Knocheninvasion kann eine spontane Fraktur resultieren oder der Tumor durchbricht die äußere Haut und wird als Wunde im Gesichtsbereich sichtbar. Oft entwickeln sich starke, in Kopf- und Halsregion ausstrahlende Schmerzen. Trotz unauffälligen klinischen Befunds kommt es knapp bei der Hälfte aller Patienten bei der Erstdiagnose zu einem Befall der Halslymphknoten. (Byers et al, 1998; Coatesworth & MacLennan, 2002; Nieuwenhuis et al, 2002; Akhtar et al, 2007; Cole & Hughes, 1997; Crean et al, 2003; Hao & Tsang, 2002; Henick et al, 1995; Kligerman et al, 1994; McGuirt et al, 1995a; O'Brien et al, 2000; Smith et al, 2004; Spiro et al, 1996) Primäre Fernmetastasen treten beim oralen Plattenepithelkarzinom nur selten auf; sie sind am häufigsten in Lunge, Leber und Knochenmark lokalisiert. (Schwenzer & Ehrenfeld, 2011) Bei einem multilokulären Tumor sind zu einem bestimmten Zeitpunkt gleich mehrere Bereiche in der Mundhöhle befallen.

Weiterhin sind B-Symptomaten wie die ungewollte Gewichtsabnahme, nächtliches Schwitzen, Müdigkeit, Appetitlosigkeit oder Fieber Symptome, die eine weiterführende diagnostische Abklärung notwendig machen. Bei den in Tabelle 1 aufgeführten klinischen Symptomen ist bei einem Fortbestehen über zwei Wochen eine Vorstellung beim Facharzt zeitnah zu veranlassen. (Hollows et al, 2000; Jones et al, 2002; Pitiphat et al, 2002; Filipits et al, 2011)

**Tabelle 1: Symptome des Plattenepithelkarzinoms der Mundhöhle**  
[nach (Pitiphat et al, 2002; Wolff et al, 2021)]

unklare Zahnlockerungen	zervikale Schwellungen
starker Mundgeruch (Foetor ex ore)	Veränderungen der Okklusion
Erythroplakie/Leukoplakie	eingeschränkte Zungenbeweglichkeit
Taubheitsgefühl	Probleme beim Sprechen
unklare Blutungen	Ulzerationen/Schleimhautdefekte
dauerhaftes Fremdkörpergefühl	Schwellungen in der Mundhöhle
Schmerzen	eingeschränkte Mundöffnung

#### 1.2.4 Diagnostik

Erste karzinomverdächtige Risikofaktoren können bereits im Anamnesegegespräch eruiert werden. Besonders bei der Nikotin- und Alkoholanamnese sollte diesbezüglich genau nachgefragt werden.

Inspektorisch ist auf Lokalisation, Größe, Kolorierung, Oberflächenbeschaffenheit, Verschieblichkeit, Konsistenz und Abgrenzung zur Umgebung zu achten. Derbe, harte, schlecht verschiebliche Tumore sind palpatorisch stets karzinomverdächtig. Bei der Erstvorstellung der betroffenen Person mit Verdacht auf ein orales Plattenepithelkarzinom ist die Palpation der submandibulären, zervikalen, nuchalen und supraclaviculären Lymphknoten beidseitig immer durchzuführen. Eine Biopsie zur Sicherung des Befunds und zur pathologischen Diagnostik ist im Rahmen des Tumor-Stagings unerlässlich, da die Therapieempfehlung und somit die Prognose aus dem Ergebnis des Stagings resultieren. (Fortin et al, 2001; Spiro et al, 1999; Weijers et al, 2002) Die Tumorbiopsie sollte erst nach der Bildgebung mit Kontrastmittel erfolgen, da es durch die Probeentnahme zu lokalen Blutungen und Gewebeerirritationen kommen kann, die das Kontrastmittelverhalten beeinflussen. In der Regel wird das Gewebe durch eine Inzisionstherapie mit dem Skalpell aus der Peripherie des Tumors gewonnen; eine Entnahme aus dem nekrotischen Zentrum ist zu vermeiden. (Wolff et al, 2021) Der Ausschluss eines zeitgleich vorhandenen Zweitkarzinoms im Pharynx- oder Larynxbereich sollte durch eine Spiegeluntersuchung innerhalb der

primären Diagnostik erfolgen. (Day & Blot, 1992; Day et al, 2003; De Vries et al, 1986; Kramer et al, 2004) Ausschließlich im Falle eines auffälligen spiegelbildlichen oder radiologischen Befunds wird die Durchführung einer endoskopischen Untersuchung notwendig. (Chow et al, 2009; Fielding et al, 2010; Kesting et al, 2009a; Kesting et al, 2009b; Lee et al, 2010; Takenaka et al, 2009)

#### 1.2.4.1 Bildgebung

Zur Überprüfung des Zahnstatus und bezüglich einer Strahlentherapie sollte vor der spezifischen Tumortherapie im Rahmen der zahnärztlichen Basisdiagnostik eine Panoramaschichtaufnahme angefertigt werden. (Leslie et al, 1999; Vidiri et al, 2007; Vidiri et al, 2010; Wolff et al, 2021) Eine Computertomographie (CT) oder Magnetresonanztomographie (MRT) gehören beim radiologischen Primär-Staging zur Standarddiagnostik. Eine Überlegenheit einer gegenüber der jeweils anderen Methode wurde nicht belegt (Bolzoni et al, 2004; Van Cann et al, 2008; Wiener et al, 2006). Beide Diagnostikinstrumente bieten eine ausreichende Darstellung der Gewebestrukturen bezüglich der Tumorausdehnung oder Knocheninvasion. (Kaanders & Hordijk 2002; Leslie et al, 1999; Vidiri et al, 2010; Vidiri et al, 2007; Woolgar & Triantafyllou, 2005) Die MRT bietet bei zu erwartenden Metallartefakten durch Zahnersatz eine bessere Darstellung des Primärkarzinoms im oralen Bereich. Keine signifikant verbesserte diagnostische Aussagekraft wird durch die Anwendung mehrerer Untersuchungsmethoden (CT, MRT, Positronen-Emissions-Tomographie(PET)-CT) erreicht. (Gu et al, 2010) Zusätzlich sollte entweder ein konventionelles Thorax-Röntgen oder ein Thorax-CT durchgeführt werden, da mit höherem T-Stadium auch die Auftretenswahrscheinlichkeit eines sekundären Lungentumors steigt. (Andrle et al, 2009; Kaanders & Hordijk, 2002) In fortgeschrittenem Tumorstadium ist die Fluorodesoxyglucose (FDG)-PET/CT zur Detektion von Fernmetastasen (Lunge, Leber, Nebennieren) geeignet; in der primären Diagnostik zur Beurteilung der lokalen Ausdehnung des oralen Tumors hat sie hingegen keinen Stellenwert. (Goerres et al, 2005; Seitz et al, 2009) Die Sonographie gilt als Standardmethode bei der Untersuchung der Halslymphknoten, allerdings ist ihre Zuverlässigkeit aufgrund der niedrigen Spezifität gering. (To EW et al, 2003) Bei der Beurteilung der Halsregion auf Lymphknotenmetastasen zeigen CT und MRT eine ähnliche



diagnostische Genauigkeit und eine Überlegenheit gegenüber der klinischen Untersuchung. (Van den Brekel et al, 1993) Bei großen Lymphknoten im CT und MRT kann die Feinnadelbiopsie oder die FDG-PET als zusätzliches Diagnoseinstrument fungieren. (Stokkel et al, 2000; Adams et al, 1998) Außerdem sollte zum Ausschluss möglicher abdomineller Metastasen eine Oberbauchsonographie durchgeführt werden.

#### 1.2.4.2 Stadieneinteilung und TNM-Klassifikation

Die Größe, die Ausdehnung und die Graduierung eines Plattenepithelkarzinoms im Mundbereich werden nach der TNM-Klassifikation beschrieben. Maligne Tumoren sollen im Rahmen des Tumor-Stagings anhand ihrer klinischen, apparativen, histologischen und zytologischen Beurteilung kategorisiert werden. Dadurch kann die Tumorthherapie besser geplant und die Prognose bezüglich kurativen beziehungsweise palliativen Verlaufs kann abgeschätzt werden. Der Franzose Pierre Denoix erarbeitete das TNM-Klassifikationssystem in den Jahren 1943 bis 1952 zur Stadienbestimmung von bösartigen Tumoren. Seit 1950 wird diese Klassifizierung von der Union international contre le cancer (UICC) verwendet. Im Jahr 1997 hat die UICC eine internationale Systematik festgelegt, die eine globale Vereinheitlichung ermöglicht. Die Klassifikation erfolgt entweder bezogen auf den Tumordurchmesser in cm oder auf die Infiltration von benachbartem Gewebe.

Die Zuordnung der Malignome wird nach drei Hauptkriterien vorgenommen:

- Tumor (T)  
Größe und Expansion (Nachbarschaftsbeziehung) des primären Karzinoms
- Node (N)  
Fehlen oder Vorhandensein von lokalen oder regionären Lymphknotenmetastasen
- Metastasis (M)  
Fehlen oder Vorhandensein von peripheren Metastasen

Daraus ergibt sich das TNM-System. Die Stadieneinteilung erfolgt mit den römischen Ziffern 0, I, II, III und IV (siehe Tabelle 2).

Nach der Expansion von Krebszellen in die lymphleitenden Wege und die Blutgefäße, dem Einwachsen von Tumorzellen in Gewebe, das den Nerv umgibt (perineurale Invasion), oder

dem Fehlen oder Vorhandensein von Residualtumorgewebe nach der Operation ist zusätzlich zur TNM-Klassifikation eine weitere Einteilung möglich:

**Tabelle 2: TNM-Klassifikation des oralen Plattenepithelkarzinoms nach UICC**  
[nach (Wolff et al, 2021)]

Tumorgröße (T)	TX	Primärtumor nicht beurteilbar
	T0	Fehlender Hinweis für primären Tumor
	Tis	Carcinoma in situ
	T1	Größte Ausdehnung des Tumors kleiner gleich 2 cm, Invasionstiefe kleiner gleich 5 mm
	T2	Größte Ausdehnung des Tumors kleiner gleich 2 cm, Invasionstiefe größer 5 mm und kleiner gleich 10 mm oder Tumor größer 2 cm aber kleiner gleich 4 cm und Invasionstiefe kleiner gleich 10 mm
	T3	Größte Ausdehnung des Tumors größer 4 cm oder jeder Tumor mit einer Invasionstiefe größer 10 mm
	T4	Tumor wächst in benachbartes Gewebe ein
Lymphknotenbefall (N)	NX	Regionale Lymphknoten nicht beurteilbar
	N0	Keine regionalen Lymphknotenmetastasen nachweisbar
	N1	Metastase in einzelner gleichseitiger Lymphknoten bis 3 cm und kein extranodales Wachstum
	N2a	Metastase in einzelner gleichseitiger Lymphknoten bis 3 cm und extranodales Wachstum; oder Metastase in einzelner gleichseitiger Lymphknoten 3 bis 6 cm und kein extranodales Wachstum
	N2b	Metastasen in multiplen gleichseitigen Lymphknoten, keiner größer als 6 cm und kein extranodales Wachstum
	N2c	Metastasen in bilateralen oder kontralateralen Lymphknoten, keiner größer als 6 cm und kein extranodales Wachstum
N3a	Metastase in einzelner Lymphknoten größer als 6 cm und kein extranodales Wachstum	

	N3b	Metastase in einzelner gleichseitiger Lymphknoten größer 3 cm und extranodales Wachstum; oder Metastase in mehreren gleichseitigen, gegenseitigen oder beidseitigen Lymphknoten, davon mindestens eine mit extranodalem Wachstum oder Metastase in einem einzelnen gegenseitigen Lymphknoten, kleiner gleich 3 cm und extranodales Wachstum
Fernmetastasen (M)	MX	Fernmetastasen nicht beurteilbar
	M0	Fernmetastasen nicht nachweisbar
	M1	vorhandene Fernmetastasen
Lymphbahnen (L)	L0	Keine Lymphgefäßinvasion
	L1	Lymphgefäßinvasion
Blutgefäße (V)	V0	Keine Veneninvasion
	V1	Mikroskopisch nachweisbare Veneninvasion
	V2	Makroskopisch nachweisbare Veneninvasion
Perineurale Invasion (Pn)	Pn0	Keine Perineurale Invasion
	Pn1	Perineurale Invasion nachweisbar
Extrakapsuläre Ausdehnung (ECE)	ECE-	Kein extrakapsuläres Wachstum von Lymphknotenmetastasen
	ECE+	Extrakapsuläres Wachstum von Lymphknotenmetastasen
Residualtumor (R)	R0	Residualtumor nicht nachweisbar
	R1	Mikroskopisch nachweisbarer Residualtumor
	R2	Makroskopisch nachweisbarer Residualtumor
	RX	Vorhandensein von Residualtumor nicht beurteilbar

Darüber hinaus kann die Beschreibung des Karzinoms durch kleingeschriebene Präfixe ergänzt und spezifiziert werden. In Tabelle 3 werden diese definiert.

**Tabelle 3: Definition der Präfixe**

[nach (Wolff et al, 2021)]

a	nach Autobiopsie
c	klinisch erstelltes Staging
p	postchirurgisch, das heißt in pathologischer Untersuchung
r	weist auf das Staging eines Rezidivtumors hin

u	durch Ultraschalluntersuchung
y	nach neoadjuvanter Chemotherapie

Durch den Certainty-Index (Sicherheitsfaktor) wird die Genauigkeit der Diagnostik im TNM-System angegeben. Die Legende für diesen ist in Tabelle 4 angeführt.

**Tabelle 4: Certainty-Index (Sicherheitsfaktor)**

[nach (Wolff et al, 2021)]

Sicherheitsfaktor (C)	C1	Basisdiagnostik (inklusive konventioneller Röntgen-Diagnostik)
	C2	spezielle Untersuchungsmethoden (Biopsie, Ultraschall, CT)
	C3	Ergebnisse der chirurgischen Exploration (Biopsie)
	C4	Erkenntnisse nach chirurgischem Eingriff
	C5	Erkenntnisse nach Autopsie

Die Klassifikation der American Joint Committee on Cancer (AJCC) legt den Grad der Tumorausdehnung gemäß der T-, N- und M-Formel zugrunde (siehe Tabelle 5).

**Tabelle 5: Stadieneinteilung der American Joint Committee on Cancer**

[nach (Wolff et al, 2021)]

Stadium	T-Klassifikation	N-Klassifikation	M-Klassifikation
0	Tis	N0	M0
I	T1	N0	M0
II	T2	N0	M0
III	T1, T2	N1	M0
oder	T3	N0, N1	M0
IVa	T1–3	N2	M0
oder	T4a	N0–2	M0
IVb	T4b	jedes N	M0
oder	jedes T	N3	M0
IVc	jedes T	jedes N	M1

### 1.2.4.3 Grading

Weiter ist die Beurteilung der Morphologie des Karzinomgewebes bedeutend bei der Klassifizierung des Tumors. Diese wird innerhalb einer histopathologischen Untersuchung bestimmt. Das dafür benötigte Gewebe stammt entweder aus einer präoperativ durchgeführten Biopsie oder aus einem intraoperativ erstellten Schnellschnitt des Tumors. Die Abweichung des Tumorgewebes von normalem, gesundem Gewebe wird als *Grading* bezeichnet.

Eine Karzinomzelle ist umso bösartiger, je weniger ausdifferenziert sie ist und je weniger sie gesundem Gewebe ähnelt. Aggressive Tumoren wachsen und rezidivieren schneller und bilden früher Metastasen. Die Anzahl der Mitosen, die Vielgestaltigkeit der Zellen, der Zellreichtum, das Vorhandensein von Nekrosen sowie die Relation von Zellen zur Interzellularsubstanz innerhalb des Karzinomgewebes dienen als Grundlage zur Beurteilung.

Die UICC teilt das Karzinomgewebe in drei, in der erweiterten Variante in vier Grade ein:

- GX Der Differenzierungsgrad des Tumorgewebes ist nicht bestimmbar.
- G1 Gut differenzierte Karzinome ähneln in ihrer histopathologischen und zytologischen Beschaffenheit den gesunden Plattenepithelzellen, das heißt, es zeigt sich eine häufige Verhornung mit differenzierten Interzellularbrücken und wenigen Mitoseraten. Atypische Mitosen und zelluläre Pleomorphien zeigen sich nicht.
- G2 Die histologische Abweichung vom ursprünglichen Gewebe findet sich häufig bei mäßig differenzierten Karzinomen. Die Verhornung ist weniger ausgeprägt und die Anzahl der Interzellularbrücken sinkt. Kernpleomorphie und Mitoserate steigen.
- G3 Schlecht differenzierte Karzinome zeigen kaum Merkmale einer plattenepithelialen Differenzierung. Eine stark ausgeprägte Kernpleomorphie und steigende Mitoseraten mit atypischen Mitosen sind diagnoseweisend.
- G4 Das Tumorgewebe ist undifferenziert.

Um therapeutisch und prognostisch optimal zu handeln, hat das Grading eine große Bedeutung. Der Grad des Gradings korreliert mit der Aggressivität des Tumors. In Tabelle 6 werden die Stufen der Differenzierung des Tumors zusammengefasst.

**Tabelle 6: Differenzierungsgrad des Tumorgewebes**  
[nach (Wolff et al, 2021)]

Grading (G)	G1	Gute Differenzierung
	G2	Mäßige Differenzierung
	G3	Schlechte Differenzierung
	G4	keine Differenzierung erkennbar
	GX	Differenzierung nicht beurteilbar

### 1.2.5 Therapie

Zu Beginn der Therapie von an einem oralen Plattenepithelkarzinom erkrankten Personen steht eine möglichst genaue Diagnosestellung. (Poh et al, 2008)

Mit dem Ziel eines kurativen Therapieergebnisses stehen mehrere Behandlungsoptionen zur Verfügung. Die behandelnden Personen müssen zusammen mit den Erkrankten zwischen einer alleinigen chirurgischen Therapie, einer alleinigen Strahlentherapie, einer kombinierten Strahlen- und Chemotherapie oder einer Kombination aus allen drei Varianten entscheiden.

Die Behandlung des oralen Plattenepithelkarzinoms ist grundsätzlich von einer Vielzahl von Faktoren abhängig. Der allgemeine gesundheitliche Zustand der erkrankten Person, der kurative oder palliative Therapieansatz, die postoperativ folgenden funktionellen und ästhetischen Einschränkungen und die Lokalisation sowie Ausdehnung des Tumors sind relevante Aspekte, die bei der Therapieplanung genau mit den Betroffenen zu besprechen und abzuwägen sind. Dabei ist darauf zu achten, dass die erkrankte Person vor Behandlungsbeginn wiederholt und umfassend über die einzelnen Optionen und postoperativen Funktionsstörungen aufgeklärt wird. Es sollten langfristige Ziele gesetzt werden, zu denen die lokale Tumorkontrolle, ein zufriedenstellendes ästhetisches Ergebnis, die Gewährleistung einer möglichst hohen Lebensqualität, sowie Funktionserhalt von Artikulation, Phonation, Kauen und Schlucken zählen. (Humphris et al, 2001a; Humphris et al, 2001b; Newell et al, 2004)

Diese Ziele werden am ehesten durch die Zusammenarbeit eines interdisziplinären Teams aus der Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie, Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde, Pathologie, Radiologie, Onkologie und Strahlentherapie erreicht. Notwendig ist vor dem Operationstermin außerdem die Kontrolle des Zahnstatus durch die hauszahnärztliche Praxis, um häufig während der Tumorbehandlung vorkommenden Komplikationen wie Strahlenkaries, Zahnverlust und Osteoradionekrose vorzubeugen. (Epstein, 1998; Denis et al, 2003)

#### 1.2.5.1 Chirurgische Verfahren

Vordergründiges Ziel bei der Behandlung des Mundhöhlenkarzinoms ist die Resektion des vollständigen Karzinoms im Gesunden. Deshalb gilt die chirurgische Tumorsektion als Mittel der ersten Wahl. Kann bei der operativen Resektion kein tumorfreier Resektionsrand erreicht werden, verschlechtert sich die Prognose deutlich. (Kovacs, 2004; Loree & Strong, 1990; Parsons et al, 1997) Folgt in diesen Fällen eine Nachresektion mit einem R0-Ergebnis, kann die lokale Tumorkontrolle nachweislich verbessert werden. (Bailey et al, 2001) Deshalb ist es von großer Bedeutung, dass der Tumor als En-bloc-Resektat mit einem Sicherheitsabstand von mindestens 1 cm in allen drei Dimensionen entfernt wird. (Haddad & Shin, 2008) Um einen tumorfreien Resektionsrand sicherzustellen, empfiehlt sich die Durchführung einer intraoperativen Schnellschnittuntersuchung. In der histopathologischen Aufbereitung des Präparats sollte eine Distanz von 3 bis 5 mm zwischen Absetzungsrand und Tumor darstellbar sein, um dieses als RO-Präparat einstufen zu können. (Rogers et al, 2009) Der histopathologische Befund sollte Informationen über Tumorlokalisation, makroskopische Tumorgöße, Tumorhistologie nach World Health Organization, Invasionsstiefe, Invasion in Blut- und Lymphgefäße oder angrenzende Strukturen, pT-Klassifikation und R-Status enthalten.

Aktuell existieren keine aussagekräftigen evidenzbasierten Studien, die die Überlegenheit der chirurgischen Therapie gegenüber der Strahlentherapie bestätigen. (Wolff et al, 2021)

Nach S3-Leitlinie zum Mundhöhlenkarzinom wird daher empfohlen, die Wahl zum operativen Vorgehen nach individuellen Kriterien, beispielsweise der Tumorsektabilität, dem Wunsch und dem allgemeinen Gesundheitszustand der erkrankten Person sowie den aus der Operation resultierenden funktionellen Beeinträchtigungen, zu treffen.

Die operativen Zugangswege sind transoral, transfazial, transzervikal oder eine Kombination daraus. Nach Möglichkeit sollten bei operationsfähigen betroffenen Personen und resektablen Mundhöhlenkarzinomen die Resektion des Tumors und die Rekonstruktion innerhalb eines chirurgischen Eingriffs erfolgen. Eine Kombination aus Operation und Strahlentherapie empfiehlt sich vor allem bei Erkrankten mit fortgeschrittenem Tumorstadium. (Dos Santos et al, 2001; Johansen et al, 2000; Rodgers et al, 1993)

Bei fehlender Invasion des Tumors in den Knochen sollte die Kontinuität des Unterkiefers erhalten bleiben. Ist dies nicht möglich, sollte durch eine Kastenresektion der Innenspange die Funktion der Mandibula bestmöglich gewährleistet werden. (Brown et al, 2002; Wolff et al, 2004; Guerra et al, 2003; Namaki et al, 2004) Bei Unterkiefersegmentresektionen wird die Kontinuität durch Knochentransplantate wiederhergestellt. (Rogers et al, 2004)

## Neck-Dissection

In den meisten Fällen eines oralen Plattenepithelkarzinoms beinhaltet das Therapiekonzept neben der chirurgischen Resektion des Tumors die Ausräumung der Halslymphknoten. Die Beurteilung der zervikalen Lymphknoten vor der Operation kann als klinisch unauffällig, suspekt oder hoch verdächtig erfolgen. Bemerkenswert ist hierbei, dass in circa 30 % der Fälle eine okkulte Metastasierung im histopathologischen Befund des Tumorpräparats gefunden wird, obwohl der ursprüngliche Befund innerhalb der präoperativen Diagnostik mit Hilfe von Ultraschall, CT und MRT zuvor als unverdächtig (cN0) eingestuft worden ist. (Crean et al, 2003; O'Brien et al, 2000; McGuirt et al, 1995; Smith et al, 2004)

Die erkrankte Person sollte darüber aufgeklärt werden, dass der Verzicht auf die präventive zervikale Lymphknotenausräumung zu einer verschlechterten Prognose führt, auch wenn die Neck-Dissection zu einem späteren Zeitpunkt doch noch erforderlich ist (Salvage Neck-Dissection) und auch durchgeführt wird. (McGuirt et al, 1995; Fakhri et al, 1989; Van den Brekel et al, 1998)

Das Committee for Neck-Dissection Classification der American Head and Neck Society hat 2002 eine einheitliche Gliederung der zervikalen Lymphknoten vorgenommen. Hierbei werden die Halslymphknoten nach Robbins in sechs Level unterteilt (siehe Tabelle 7).



**Tabelle 7: Lymphknotenlevel**

[nach (Robbins et al, 2002)]

<b>Level</b>	<b>Bezeichnung</b>	<b>anatomische Begrenzung</b>
IA/IB	submentale/submandibuläre Knoten	ventral und dorsal des vorderen Digastrikusbauches
IIA/IIB	obere juguläre Lymphknotengruppe	ventral und dorsal der Vena jugularis
III	mittlere juguläre Lymphknotengruppe	zwischen Höhe des Zungenbeins und Membrana cricothyroidea
IV	untere juguläre Lymphknotengruppe	zwischen Höhe der Membrana cricothyroidea und Clavicula
VA/VB	hinteres Halsdreieck	zwischen Sternocleidomastoideus und Trapezius oberhalb und unterhalb des Omohyoideus
VI	anteriore prätracheale Lymphknotengruppe	zwischen Höhe des Hyoids und Jugulum

Bei der elektiven Neck-Dissection liegt der Lymphknotenstatus präoperativ als cNO-Befund vor, hingegen gibt es bei der kurativen Neck-Dissection aufgrund von Voruntersuchungen bereits Anzeichen für eine lymphogene Metastasierung. Es werden hierbei die betroffenen Lymphknoten und – je nach Ausdehnung und Staging – zusätzliche Lymphknotengruppen uni- oder kontralateral entfernt. In Tabelle 8 sind die Varianten der Halslymphknotenausräumung dargestellt.

**Tabelle 8: Nomenklatur der Halslymphknotenausräumung**

[nach (Robbins et al, 2002)]

<b>Klassifikation</b>	<b>Abkürzung</b>	<b>Charakteristika</b>
radikale Neck-Dissection	RND	Ausräumung der Level I–V Entfernung folgender nichtlymphatischer Strukturen: - Nervus accessorius - Vena jugularis interna - Musculus sternocleidomastoideus
modifizierte radikale Neck-Dissection	MRND	Ausräumung der Level I–V unter Erhalt einer oder mehrerer nichtlymphatischer Strukturen (siehe RND)

selektive Neck-Dissection	SND	Ausräumung von weniger Leveln als I–V, meist prophylaktisch Level I–III
erweiterte radikale Neck-Dissection	ERND	Ausräumung weiterer Lymphknotengruppen, zum Beispiel Glandula parotidea, oder weiterer nichtlymphatischer Gewebe, zum Beispiel Arteria carotis interna

Da Mundhöhlenkarzinome meist in die Level I bis III metastasieren, wird die Ausräumung dieser Bereiche standardmäßig empfohlen. Nur in 1 % der Fälle findet sich eine Ausdehnung bis zu Level V. (Shah et al, 1990; Byers et al, 1988; Jin et al; 2008)

Der Goldstandard bei unverdächtigem Lymphknoten-Staging ist deshalb die selektive Neck-Dissection der Level I bis III. (Dias et al, 2001; Ho et al, 1992; McGuirt et al, 1995; Wolfensberger et al, 2001) Die Entscheidung dafür ist unabhängig von der Tumorgröße zu treffen.

Dieses Vorgehen wurde in einschlägigen Studien bestätigt, da bei unauffälligem Lymphknotenstatus keine Unterschiede zwischen der selektiven, der modifizierten radikalen und der radikalen Neck-Dissection aufgezeigt wurden. (Yu et al, 2006; Spiro et al, 1996; Leon et al, 2001)

Die Tatsache, dass jedes vierte bis fünfte orale Plattenepithelkarzinom okkult metastasiert, rechtfertigt die Indikation zur selektiven Neck-Dissection selbst bei einem initialen Primärbefund. (Van den Brekel et al, 1998; McGuirt et al, 1995; Fakhri et al, 1989)

Bei Zungenkarzinomen wird zusätzlich die Lymphknotenausräumung des Level IV empfohlen, da diese häufig in die untere juguläre Lymphknotengruppe metastasieren. (Byers et al, 1997)

Eine Metastasierung des Levels IIb findet nur selten statt; da sie meistens bei Zungenkarzinomen auftritt, ist eine Ausräumung dieses Levels bei lingualem Befall unbedingt erforderlich. (Corlette et al, 2005; Elsheikh et al, 2005; Lim et al; 2004) Bei Mundbodenkarzinomen mit präoperativer N0-Situation kann hingegen eventuell darauf verzichtet werden. (Santoro et al, 2008)

Bei einem Mundhöhlenkarzinom des Oberkiefers im Bereich des harten Gaumens oder des Alveolarfortsatzes kann eine Neck-Dissection der Level I bis III umgangen werden, vorausgesetzt die Tumorgröße T1 konnte histologisch bestätigt werden, es liegt klinisch und radiologisch ein Lymphknotenstatus N0 vor, die Invasionstiefe liegt unter 3 mm und eine Nachkontrolle kann in geringen Abständen ermöglicht werden. (Wolff et al, 2021)

Bei unauffälligem Lymphknotenstatus hat die Neck-Dissection auch diagnostisch große Bedeutung. Die entfernten Lymphknotengruppen werden intraoperativ histologisch durch Schnellschnitte in der Pathologie untersucht. Bei nachgewiesener Metastasierung wird die Neck-Dissection ipsilateral auf die Bereiche IV und V und kontralateral auf die Bereiche I bis III erweitert. (Iype et al, 2008; Liaw et al, 2006)

Ob nach der operativen Tumorresektion eine Bestrahlung oder Radiochemotherapie erfolgt, hängt ebenfalls vom histopathologischen Ergebnis der Lymphknotenausräumung ab.

In kontrollierten Studien wurde diesbezüglich angedeutet, dass die Biopsie des Sentinel-Lymphknotens der elektiven Neck-Dissection bezüglich der Aufdeckung von Lymphknotenmetastasen gleichbedeutend ist. (Liu et al, 2017) Hinsichtlich der postoperativen Lebensqualität, der Komplikationsrate und der funktionellen Einschränkungen verzeichnet die Wächterlymphknoten-Biopsie sogar Vorteile, weshalb sie sich noch vor den konventionellen Ausräumungen bei kleinen transoral resektablen Mundhöhlenkarzinomen ohne Notwendigkeit eines transzervikalen Zugangs zur zuverlässigen Beurteilung des Lymphknotenstatus eignet. (Moya-Plana et al, 2018)

Beträgt die Invasionstiefe des Karzinoms mehr als 4 mm, zeigt sich oftmals ein gleichseitiger Befall der Halslymphknoten. (Byers RM et al, 1998)

Eine beidseitige Lymphknotenausräumung ist bei zunehmender Tumorgröße, beim Nachweis mehrerer ipsilateraler Lymphknotenmetastasen und bei schlecht differenziertem Tumorgewebe notwendig. Außerdem stellen die Diagnose eines Mundbodenkarzinoms oder ein Tumor im Mittellinienbereich meist ebenfalls eine entsprechende Indikation dar. (Bootz et al, 2008)

Besteht präoperativ der Verdacht einer lymphogenen Metastasierung, wird eine modifizierte radikale Neck-Dissection empfohlen (Patel et al, 2008; Rapoport et al, 2007), da die

Lebensqualität durch das Belassen des Nervus accessorius wesentlich erhalten werden kann. (Inoue et al, 2006; Laverick et al, 2004) Dieses Vorgehen ist in der Tatsache begründet, dass sich in einschlägigen Studien die modifizierte selektive Neck-Dissection bezüglich der Tumorkontrolle als genauso zuverlässig erwiesen hat wie die radikale Neck-Dissection. (Kohler et al, 2010; Patel et al, 2008)

Während des chirurgischen Eingriffs wird die Neck-Dissection vor der eigentlichen Tumorentfernung durchgeführt. Durch die Anlage einer vorübergehenden Tracheotomie wird das Freihalten der Atemwege sichergestellt, insbesondere bei zu erwartenden operationsbedingten Schwellungen.

Ein postoperatives Risiko nach einer Neck-Dissection stellt die Dysfunktion des Ramus marginalis, eines Astes des Nervus facialis, dar. Daraus können anhaltende Asymmetrien im Mundwinkelbereich resultieren, da die Funktion des Musculus depressor labii inferioris oder des Musculus depressor anguli oris durch eine intraoperative Nervenschädigung beeinträchtigt werden kann. Allerdings kann diese Komplikation durch die Kombination aus einer optimalen Schnittführung etwa 2,5 cm unterhalb des Unterkieferrands mit einem während des chirurgischen Eingriffs durchgeführten Nervenmonitorings meist vermieden werden. Klagt der Patient über Schluck- und Sprachbeschwerden oder über Geschmacksausfälle – auch nachdem sich unmittelbare operations- und schwellungsbedingte Einschränkungen reduziert haben –, kann es intraoperativ zu einer Hypoglossus- oder Lingualisläsion gekommen sein. Eine der häufigsten operationsbedingten Komplikationen ist die Schädigung des Nervus accessorius. Damit geht für den Patienten die Funktionseinschränkung einher, den Arm in der Schulter über 90° anzuheben. (Pagedar & Gilbert, 2009). Besteht die Notwendigkeit, das Level IV oder V auszuräumen, kann es in 2 bis 5 % der Fälle zu einer Chylusfistel kommen. Dabei wurde der Eintritt des Ductus thoracicus in den linken Venenwinkel eingeengt, woraus durch Elektrolyt- und Flüssigkeitsverschiebungen ein lebensgefährlicher Volumenmangel resultieren kann. (Gregor, 2000) Darüber hinaus kann es wie bei allen größeren operativen Eingriffen auch bei einer Neck-Dissection zu Wundheilungsstörungen oder Infektionen kommen.

## Defektdeckung und Rekonstruktion

Die Resektion ausgedehnter Primärtumore verursacht häufig voluminöse Gewebedefekte, die meist nicht direkt verschlossen werden können. Deshalb ist die Planung eines rekonstruktiven Konzepts innerhalb der chirurgischen Therapie unbedingt erforderlich. In diesem Zusammenhang sollten der gesundheitliche Zustand sowie die zu erwartende ästhetische und funktionelle Verbesserung gegen den operativen Aufwand und die Beeinträchtigung der betroffenen Person abgewogen werden. (Suh et al, 2004)

Die Rekonstruktion des Gewebedefekts durch einen mikrovaskulären Gewebelappen gilt momentan als Mittel der ersten Wahl. (Chiarini et al, 2002; Hayden et al, 1999; Makitie et al, 2003)

Wesentliche Ziele des Gewebeersatzes sind das Erreichen einer bestmöglichen Lebensqualität, der Erhalt oder die Wiederherstellung ausreichender Kau-, Sprech- und Schluckfunktionen und ein zufriedenstellendes ästhetisches Ergebnis. Gewebedefekte im Oberkiefer- und Orbitabereich werden durch Defektprothetik oder Epithetik versorgt. (Wolff et al, 2021)

Die intra- und extraoral durch die Tumorsektion entstandenen Defekte können durch unterschiedliche Verfahren versorgt werden. Während kleine Gewebedefekte oftmals direkt verschlossen werden können oder abheilen, kommen bei großflächigen Rekonstruktionen meist autogene Gewebetransplantationen wie lokale Lappenplastiken, freie Haut-, Schleimhaut- oder Knochentransplantationen, muskelgestielte Transplantate oder mikrochirurgisch anastomosierte Transplantate zum Einsatz.

### 1.2.5.2 Strahlentherapie

Sofern ein kuratives Behandlungsziel verfolgt wird, kann die Strahlentherapie zur Verbesserung der lokalen Tumorkontrolle entweder allein oder in Kombination mit einer Chemotherapie eingesetzt werden. Eine neoadjuvante Bestrahlung erfolgt in den Wochen vor der Operation, eine adjuvante Bestrahlung findet danach statt. In einer palliativen Situation können die Symptome durch eine alleinige Chemotherapie gelindert werden. Indikationen für eine Radio- oder Radiochemotherapie sind ein ausgedehntes T-Stadium (T3/T4), die

lokale R1- oder R2-Situation ohne erfolgte Nachresektion, ein zu geringer Sicherheitsabstand, eine Invasion in Gefäße oder Nerven oder ein nachgewiesener Befall der zervikalen Lymphknoten. (Bernier et al, 2004) Die ionisierende Strahlung kann entweder extern über die Haut oder intern durch implantierbare Katheter in den Tumor appliziert werden.

Die Gesamtdosis der Strahlentherapie kann je nach Anwendung unterschiedlich verabreicht werden. Die konventionelle Fraktionierung sieht eine Bestrahlung fünfmal wöchentlich mit einer Einzeldosis von 1,8 bis 2,0 Gy vor, um eine Gesamtdosis von 70 Gy zu erreichen. In meist palliativen Situationen kommt die Hypofraktionierung mit hohen Einzeldosen von über 2 Gy zum Einsatz. Bei der Hyperfraktionierung wird die Einzeldosis hingegen bei häufigerer Anwendung reduziert, die Gesamtdosis kann dadurch bis zu einem wöchentlichen Maximum von 10 Gy gesteigert werden. Bei der akzelerierten Bestrahlung ergibt sich eine Erhöhung der wöchentlichen Gesamtdosis bei gleichzeitiger Reduktion der Behandlungszeit. Bei alleinig durchgeführter primär perkutaner Bestrahlung zeigten neuere Metastudien eine bessere lokale Tumorkontrolle und eine signifikante Verbesserung des Gesamtüberlebens bei der alternativen Fraktionierung (Hyperfraktionierung beziehungsweise Akzelerierung), verglichen mit der konventionellen Fraktionierung. Vor allem für erkrankte Personen unter 50 Jahren wird bei alternativer Fraktionierung ein längeres Überleben prognostiziert. (Bourhis et al, 2006; Glenny et al, 2010)

Die Gesamtbehandlungszeit sollte möglichst kurz und ohne Unterbrechung gestaltet werden, um die Gefahr der Repopulierung und eine Verschlechterung der lokalen Tumorkontrolle zu vermeiden. (Jacobsen et al, 2007; Robertson et al, 1998)

Neben der Wirkung auf den Tumor kommt es durch die Radiotherapie auch zu strahlenbedingten Nebeneffekten auf umgebende Strukturen. Die Strahlentoxizität beschränkt somit die Gesamtdosis der Strahlenbehandlung trotz maximalen Gewebeschatzes; dabei wird eine Klassifizierung von Grad 1 bis 4 (1 = mildeste Toxizität, 4 = stärkste Toxizität) vorgenommen. (Cox et al, 1995; The National Cancer Institute, 2006)

Die Gesamtdosis, die Einzeldosis und die Länge der Therapie sind die Hauptfaktoren, die die Wirkung der Strahlenbehandlung auf das Karzinom und dessen umgebende Strukturen beeinflussen.

Dass die Brachytherapie (implantierbare Bestrahlungsquelle) eine bessere Tumorkontrolle oder eine gesteigerte Gesamtüberlebensrate gegenüber der perkutanen Radiotherapie aufweist, ist wissenschaftlich nicht belegt. (Wolff et al, 2021) Zur Vermeidung von strahlenbedingten Komplikationen sollte eine maximale Gesamtdosis von 65 Gy nicht überschritten werden. (Mazon et al, 1990)

Die intensitätsmodulierte Radiotherapie (IMRT) verfolgt das Ziel, strahlenbedingte Nebenwirkungen bei gleichzeitig guter Tumorkontrolle zu reduzieren, indem die Dosis im Bereich der Ohrspeicheldrüse reduziert und das Auftreten einer Xerostomie verringert wird. (Chao et al, 2001)

Eine Xerostomie bezeichnet eine starke Mundtrockenheit, verursacht durch die Bestrahlung im Bereich der Ohrspeicheldrüsen. Eine häufige Komplikation bei Bestrahlungen im Kopf- und Halsbereich ist die Mukositis. Dabei werden die Schleimhäute inklusive der Mukosa so stark geschädigt, dass der Schluckakt und die Nahrungsaufnahme aufgrund starker Schmerzen nur noch eingeschränkt möglich sind. In dieser Situation kann eine temporäre perkutane endoskopische Gastrostomie(PEG)-Sonde angebracht werden, um weiterhin einen ausreichenden Ernährungszustand zu gewährleisten. (Cox et al, 1995) Eine optimale Zahn- und Mundpflege sind zur Behandlung oder Prophylaxe einer Mukositis notwendig. Die Sanierung des Zahnstatus vor dem Beginn einer Strahlentherapie und der Einsatz einer Fluoridierungs- oder Distanzschiene während der Bestrahlung sollen der Entstehung einer Strahlenkaries entgegenwirken. (Denis et al, 2003; Epstein et al, 1998) Bei 5 % aller im Kopf-Hals-Bereich bestrahlten Personen kann es zu einer Osteoradionekrose des Kieferknochens kommen. Diese Komplikation ist schwerwiegend, da eine Infektion der Nekrose zum Verlust des Knochens führen kann, was eine aufwendige chirurgische Sanierung notwendig macht. (Wolff et al, 2021) Liegt der tumorbefallene Knochen innerhalb des Strahlenfelds, ist das Risiko für eine Osteoradionekrose deutlich erhöht. (Crean et al, 2003; Tong et al, 1999; Turner et al, 1996)

### 1.2.5.3 Radiochemotherapie

Die Kombination aus Strahlen- und Chemotherapie bei Plattenepithelkarzinomen der Kopf-Hals-Region führt laut einschlägigen Studien zu einem Überlebensvorteil von 17 %.

Junge Betroffene (< 60 Jahre) zeigen sogar eine Rate von 22 bis 24 % und profitieren somit am meisten von dieser Therapie. (Bernier et al, 2004; Pignon et al, 2000) Die alleinige Chemotherapie stellt keine geeignete Option für eine kurative Therapie dar. (Wolff et al, 2021)

Meist wird die Chemotherapie nach der operativen Tumorsektion parallel zur Strahlentherapie durchgeführt (adjuvante Radiochemotherapie). Die Fünf-Jahres-Gesamtüberlebensrate verbessert sich bei erkrankten Personen mit einem nichtmetastasierten Kopf-Hals-Karzinom bei einer neoadjuvant durchgeführten Chemotherapie mit Cisplatin und 5-Fluoruracil (5-FU) gegenüber der alleinigen Operation statistisch signifikant um 5 %; die Kombination aus Bestrahlung und Chemotherapie konnte sowohl bei operablen als auch bei nicht operablen Tumoren eine Verbesserung der Fünf-Jahres-Überlebensrate von 8 % erzielen. Zusätzlich wurde bei der Kombinationstherapie die Tumorkontrolle ebenfalls um 8 % verbessert. (Pignon et al, 2000)

Auf der einen Seite erzielt die Kombinationstherapie Überlebensvorteile, auf der anderen Seite steigert sie strahlenbedingte Nebenwirkungen. Dazu zählen eine negative Auswirkung auf die Blutbildung, eine verstärkte Mukositis und häufigere Zahnschäden wie Strahlenkaries. (Luukkaa et al, 2002; Denis et al., 2003; Calais et al, 1999; El-Sayed et al, 1996; Fountzilias et al, 2004; Henk et al, 2003)

Die postoperative Radio- oder Radiochemotherapie ist vor allem bei knappen Resektionsrändern im Gesunden (Resektionsrand < 5 mm), extrakapsulärem Tumorwachstum, einem fortgeschrittenen Tumorstadium, multiplem Lymphknotenbefall oder Gefäß- oder Nerveninfiltration indiziert. (Bernier 2004; Bernier, 2007) Das Gesamtüberleben nach 3 Jahren ist in diesen Situationen signifikant erhöht. (Huang et al, 1992)

Monozentrische Studien konnten aufzeigen, dass bei kleinen, oberflächlichen Mundhöhlenkarzinomen eine Heilung nicht nur operativ, sondern auch strahlentherapeutisch möglich ist. (Rodgers et al, 1993; Iyer et al, 2004)

Eine Kombination aus Radiochemotherapie und Operation sollte bei kurativen Mundhöhlenkarzinomen im fortgeschrittenen Stadium stattfinden, jedoch nicht im initialen. (Rodgers 1993)



Die Radiochemotherapie sollte nach Möglichkeit in spezialisierten Zentren durchgeführt werden, um die erwähnten Komplikationen zu verringern. (Wolff et al, 2021)

Die postoperative Strahlentherapie sollte möglichst bald nach der Operation begonnen werden und spätestens 11 Wochen nach der Tumoresektion beendet sein. Dabei sollte bei mittlerem Risiko eine konventionell fraktionierte Therapie gewählt werden, wobei eine Gesamtdosis von 54 bis 60 Gy in 27 bis 30 Fraktionen in einem Zeitraum von 5,5 bis 6 Wochen appliziert wird. Bei erhöhten histopathologischen Risikokriterien für ein Tumorrediv sollte die postoperative Bestrahlung mit 66 Gy in 33 Fraktionen über 6,5 Wochen erfolgen. (Bernier et al, 2004; Sanguineti et al, 2005)

#### 1.2.5.4 Palliativtherapie

In einer palliativen Situation ist die Tumorerkrankung so weit fortgeschritten, dass eine chirurgische Resektion nicht mehr möglich ist und zugleich durch eine Strahlentherapie kein kurativer Therapieerfolg mehr erwartet werden kann. In manchen Fällen limitiert der Allgemeinzustand der erkrankten Person den Behandlungsplan, wobei diese gesundheitlich nicht in der Lage ist, einen operativen Eingriff oder eine Strahlentherapie zu überstehen.

Eine palliative Situation liegt vor, wenn bei einem lokoregionalen Rezidiv eine Salvage-Therapie aufgrund eines stark vorgeschädigten Operationsgebiets infolge vorausgegangener radikaler chirurgischer oder konservativer Eingriffe nicht mehr möglich ist, bereits Fernmetastasen vorliegen oder der Allgemeinzustand der erkrankten Person stark herabgesetzt ist.

Betroffene, die sich in einer palliativen Situation befinden, sollten frühzeitig professionell unterstützt werden, da die Erkrankung in diesem Stadium meist von psychischen und physischen Problemen begleitet wird.

Die krankheitsassoziierten Beeinträchtigungen können bei inkurablen Mundhöhlenkarzinomen durch palliative, chirurgische oder radiologische Maßnahmen reduziert werden.

Die Steigerung der Lebensqualität durch eine palliative Chemotherapie, verglichen mit alleinigen supportiven Maßnahmen, konnte bisher wissenschaftlich nicht belegt werden. Bei Erkrankten mit einem inkurablen Kopf-Hals-Karzinom konnte bei der Durchführung einer

Chemotherapie mit palliativem Therapieansatz eine Ansprechrate von 10 bis 35 % erzielt werden. (Awwad et al, 2002; Bachaud et al, 1996; Bernier et al, 2005)

Laut der randomisierten Phase-III-Studie *Extreme* gilt bei erkrankten Personen in palliativem, aber gutem Allgemeinzustand die Kombinationstherapie aus platinbasierter Chemotherapie mit 5-Fluorouracil und dem gegen Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) gerichteten Antikörper Cetuximab als Goldstandard. Eine Erhaltungstherapie mit Cetuximab sollte nach 4 bis 6 Zyklen dieser Kombinationstherapie bei Ausbleiben einer Progression angeschlossen werden. (Vermorken et al, 2008) Hingegen sollte bei Betroffenen in einem reduzierten Allgemeinzustand eine Kombinationstherapie mit hoher Toxizität nach Möglichkeit vermieden werden – vielmehr wird eine Monotherapie empfohlen. (Bonner et al, 2006) Bei einer Therapie mit hochdosiertem Cytarabin zusammen mit Cisplatin beziehungsweise 5-FU wurde eine Ansprechrate von 57 % festgestellt. (Jelic et al, 2002)

Bei ausbleibender Wirksamkeit einer platinhaltigen Erstlinientherapie stellt ein Checkpoint-Inhibitor eine Zweitlinientherapieoption dar.

Die Anwendung einer Kombination aus mehreren Zytostatika erhöht die Ansprechrate, die Überlebensrate bleibt unverändert und die Toxizität auf den gesamten Körper und insbesondere auf das Blutbildungssystem erhöht sich. (Awwad et al, 2002; Bachaud et al, 1996; Bernier et al, 2005)

Evidenzbasierte Studien, die eine effiziente Behandlungsoption beim inkurablen oralen Plattenepithelkarzinom bestätigen könnten, existieren auch nicht für die palliative Strahlentherapie.

Laut einer einschlägigen klinischen Studie führt die Anwendung einer palliativen Strahlentherapie mit 20 Gy in 5 Sitzungen über 5 Tage bei 55 % der an einem unheilbaren, fortgeschrittenen Kopf-Hals-Tumor Erkrankten zu einer langfristigen Verbesserung der Symptome. (Mohanti et al, 2004; Stevens et al, 2011)

Verspricht die palliative Therapie durch chirurgische Intervention die Tumorverkleinerung, die Symptomlinderung, die Schmerzreduktion, die Verbesserung der Atmung oder die Verhinderung einer Arrosionsblutung, ist sie in jedem Fall gerechtfertigt.

Die Kontrolle der palliativen Situation und der Systemtherapie sollte durch regelmäßige Schnittbildgebung im Abstand von 6 bis 12 Wochen erfolgen, um bei Bedarf einen zeitnahen Therapiewechsel auf eine wirksame Zweitlinientherapie planen zu können.

#### 1.2.5.5 Rezidivtherapie

Jede fünfte erkrankte Person mit einem oralen Plattenepithelkarzinom erleidet im Verlauf der Erkrankung ein lokoregionales Tumorrezidiv, das häufig in eine palliative Situation führt. Als Therapie kann eine erneute Operation (Salvage-Operation) durchgeführt werden; zusätzlich können die Betroffenen eine Radio- oder Radiochemotherapie erhalten. Wächst das Rezidiv lokoregional, ist resektabel und fand bei der Erstdiagnose schon eine Strahlentherapie oder Operation statt, sollte eine Salvage-Operation angestrebt werden. Die Rezidiv-Operation sollte in einem spezialisierten chirurgischen Zentrum mit ausreichender Erfahrung in umfangreichen Rekonstruktionen und mit Anschluss an eine intensivmedizinische Abteilung durchgeführt werden. (Goodwin 2000; Agra et al, 2003)

Für das Mundhöhlenkarzinom ergab sich in einer Metaanalyse ein Fünf-Jahres-Gesamtüberleben von 43,4 % bei operativer Rezidivresektion und vorausgegangener Bestrahlung. (Goodwin, 2000) Mit zunehmendem Stadium des Tumorrezidivs nimmt das krankheitsfreie Überleben ab und die Anzahl an Komplikationen zu. (Goodwin, 2000; Agra et al., 2003) Ist das Rezidiv nicht resektabel oder würde ein chirurgisches Vorgehen die Lebensqualität stark einschränken, wird als therapeutisches Vorgehen oftmals eine Radio- oder Radiochemotherapie empfohlen, da bei vorherigem, ausschließlich chirurgischem Vorgehen eine hohe Tumordosis gewählt werden kann. In kleineren Studien konnte eine Fünf-Jahres-Überlebensrate von 9 bis 20 % bei einer 11 bis 50 % besseren Tumorkontrolle verzeichnet werden, die zusätzlich signifikant verbessert werden konnte, wenn die zweite Bestrahlung mit mehr als 50 Gy durchgeführt wurde. (Haraf et al, 1996) Bei einem vorbestrahlten Rezidivgebiet kann eine erneute Bestrahlung durchgeführt werden. Von einer Brachytherapie mit 60 Gy als Monotherapie profitieren vor allem erkrankte Personen mit früh diagnostizierten Tumorrezidiven (T1N0 und T2N0) oder mit Zweitkarzinomen in einem vorbestrahlten Bereich. Dies zeigt sich anhand des Fünf-Jahres-Gesamtüberlebens von 30 % und der lokalen Tumorkontrolle von 69 bis 80 %. (Peiffert et al, 1994) Die Mitbestrahlung des

umgebenden lokalen Gewebes verursacht in 9 bis 18 % der Fälle Strahlenspätchäden, die komplikationsreich verlaufen können. Nach einer Zweitbestrahlung wurde bei 41 % eine Muskelfibrose im Halsbereich beobachtet, bei ebenfalls 41 % kamen Mundschleimhautnekrosen vor, bei 30 % entstand ein Trismus und bei 11 % zeigten sich letale Komplikationen. (Haraf et al, 1996; Ohizumi et al, 2002)

Im Falle eines Rezidivs sollte die Therapieentscheidung des individuellen Falls interdisziplinär in einem Tumorboard diskutiert werden. Das Stadium des Tumorrezidivs, die Resektabilität, vorausgegangene Therapien und die therapeutischen Erfolgsaussichten sind entscheidungsfindende Faktoren. Die betroffene Person und die Angehörigen sollten ausführlich über die Behandlungsrisiken und die Prognose von operativen und konservativen Therapieoptionen sowie über die eventuelle Einschränkung der Lebensqualität informiert werden. Nach histopathologischer Befundsicherung und Re-Staging sollte unter Rücksichtnahme auf den Allgemeinzustand und unter Einbeziehung des persönlichen Willens des Patienten eine möglichst passende Therapie ausgewählt werden. Auch die Option einer Palliativtherapie sollte in Erwägung gezogen werden. (Wolff et al, 2021)

### 1.2.6 Prognose

Für eine Prognose bezüglich des Krankheitsverlaufs eines oralen Plattenepithelkarzinoms ist die Einteilung des Tumors laut TNM-Klassifizierung und dem sich daraus ergebenden UICC-Stadium von entscheidender Bedeutung.

Prognostisch von großer Relevanz ist der Lymphknotenstatus. Diesbezüglich ist es sinnvoll, zwischen N0 und N1 zu unterscheiden. (Layland et al, 2005) Bei Vorhandensein von Lymphknotenmetastasen (N1 bis N3) sinkt die Überlebensrate um 50 %, bei einer beidseitigen Metastasierung um weitere 25 %. (Jayachandran & Sachdeva 2012)

Tumordurchmesser, -volumen und -dicke stellen weitere entscheidende Faktoren bezüglich der Prognose dar. (Plataniotis et al, 2004; Woolgar, 2006) Überschreitet die Dicke des Tumors 4 mm, ist dies mit einer ungünstigeren Prognose assoziiert. (Carinci et al, 1998; Nishimaki et al., 2002; O'Brien et al., 2003b) Hat das Karzinom bereits systemisch Metastasen gestreut, versterben die meisten Patienten innerhalb eines Jahres. Zusammenfassend lässt

sich daraus schließen: Je höher die TNM-Klassifizierung ausfällt, desto schlechter ist die Prognose. (Carinci et al, 1998; Nishimaki et al, 2002; O'Brien et al, 2003b)

Der Einfluss des Gradings auf die Prognose ist fraglich. Innerhalb eines Karzinoms liegen Bereiche unterschiedlicher Wachstumstendenz, wodurch sich auch Unterschiede im Differenzierungsgrad ergeben. Hieraus resultiert die Schwierigkeit, dass sich der Differenzierungsgrad einer Probebiopsie präoperativ erheblich von dem des histologisch untersuchten Tumorresektionspräparats unterscheiden kann. Deshalb ist die Aussagekraft des Differenzierungsgrads des Exzisionengewebes präoperativ bezüglich der Prognose gering. (Schwenzer & Ehrenfeld, 2011)

Spindelzellige und basaloide Karzinome zeigen eine wesentlich schlechtere Prognose im Vergleich zu papillären und verrukösen Formen. (Huber et al, 2011) Bei unklarem Status des Resektionsrands, bei großen Tumoren, gegebenenfalls sogar mit Einwachsen in Blut- und Nervengefäße, bei Lymphknotenmetastasen von über 3 cm im Durchmesser oder bei beidseitiger lymphogener Metastasierung kommt es zum gehäuften Auftreten eines Rezidivs. (Ang et al, 2001; Hinerman et al, 2004; McMahon et al, 2003; Woolgar et al, 2003) Weiterhin gehen die Ruptur der Kapsel und eine daraus resultierende extrakapsuläre Invasion von Lymphknotenmetastasen (ECI) mit einem erhöhten Risiko für die Ausbildung eines lokalen Rezidivs oder von Fernmetastasen einher. (Greenberg et al, 2003a)

Auch das Einsprossen der Tumorzellen in Lymph- und Blutgefäße ist von hoher prognostischer Relevanz. Daraus ergeben sich ein gehäuftes Vorkommen an Rezidiven und Fernmetastasen sowie eine prognostische Verschlechterung. (McMahon et al, 2003; Woolgar & Triantafyllou, 2005)

### 1.3 Tumorwachstum und Metastasierung

Seit Jahrzehnten stehen auf Platz 2 der häufigsten Todesursachen nach Herz-Kreislauf-Erkrankungen bösartige Krebserkrankungen. (Statistisches Bundesamt, 2018) Die Entstehung eines Malignoms wird multifaktoriell verursacht. So können Komponenten wie eine erhöhte Strahlenbelastung, chronische Infektionen, eine positive Familienanamnese oder eine ungünstige Ernährung zu einer Mutation der DNA führen. Dadurch wird eine Störung

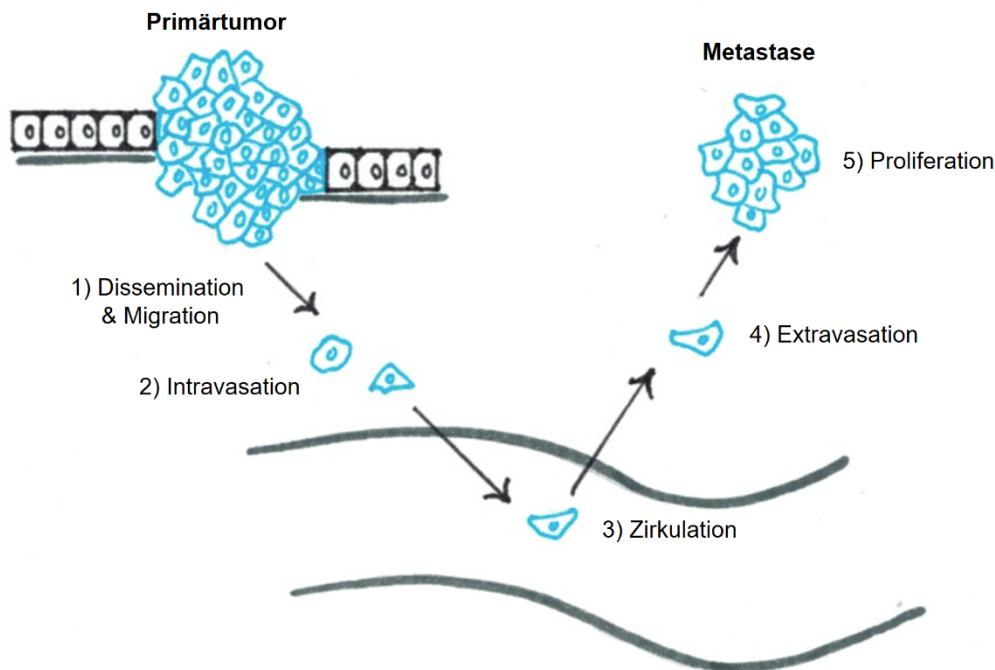
des genetischen Zellprogramms verursacht, was das Wachstum eines Tumors induzieren kann. (Nowell, 1976)

Tumoren sind komplexe Strukturen, bestehend aus Tumorzellen und dem umgebenden Gewebe. Ihre Entstehung erfolgt in mehreren Schritten, die in sechs Änderungen der Zellphysiologie beschrieben werden: (Hanahan & Weinberg, 2000; Konntongkaew, 2013)

- unbegrenzte Replikation
- unkontrollierte Produktion von Wachstumsfaktoren
- Resistenz gegenüber wachstumshemmenden Signalen
- Umgehung der Apoptose
- Aktivierung der Angiogenese
- Gewebeinvasion und Metastasierung.

Diese sechs Prozesse sind auch als *Hallmarks of Cancer* bekannt und wurden nachträglich um einen weiteren Faktor, die genetische Instabilität, ergänzt. (Negrini et al, 2010)

Die Gewebeinvasion und die Metastasierung sind die bedeutendsten Merkmale der Malignome. Durch den Verlust der Zell-Zell-Kontakte, die Neustrukturierung der extrazellulären Gewebematrix und die Migration der Tumorzellen wird die Gewebeinvasion ermöglicht. Der komplexe Prozess der Metastasierung erfolgt in mehreren Schritten (siehe Abbildung 1). Beginnend mit dem Verlust der Kontakte zu den Nachbarzellen durchbricht die metastasierende Zelle die extrazelluläre Matrix (EZM), es kommt zur Intravasation eines Blutgefäßes, Zirkulation im Blut und Extravasation an einem entfernten Ort, an dem durch Stimulation der Neoangiogenese das Wachstum einer Metastase ausgelöst werden kann. (Valastyan & Weinberg, 2011)



**Abbildung 1: Schritte bei der Metastasierung**

**1.** Dissemination und Migration: Karzinomzellen lösen sich aus dem Gewebeverbund und durchbrechen die extrazelluläre Gewebematrix, **2.** Intravasation: Penetration des Endothels und Eintritt in das Blutgefäßsystem, **3.** Zirkulation im Gefäß, **4.** Extravasation: Austritt aus dem Zirkulationssystem in das Zielorgan, **5.** Proliferation und Ausbildung einer Metastase

Eigene Skizze

angelehnt an: [http://geb.uni-giessen.de/geb/volltexte/2019/13985/pdf/LammertAngela\\_2019\\_01\\_21.pdf](http://geb.uni-giessen.de/geb/volltexte/2019/13985/pdf/LammertAngela_2019_01_21.pdf)

Zellen enden in der Apoptose, wenn der Anschluss an die Blutversorgung über 100 µm beträgt. Dies verdeutlicht, dass die Angiogenese essenziell für die Entstehung von Metastasen ist. Sobald der Tumor eine Größe von wenigen Millimetern erreicht hat, wird die Angiogenese induziert, um die Versorgung des Tumors mit Nährstoffen und Sauerstoff sicherzustellen. (Koontongkaew, 2013; Folkman, 2002) Lokalisation, Größe, Dicke und Invasionstiefe des primären Karzinoms beeinflussen das Metastasierungsmuster, das sich entlang der anatomischen Lymphabflusswege ausbreitet. (Pagedar et al, 2009; Ferlito et al, 2009) Meist haben zervikale Lymphknotenmetastasen ihren Ursprung in epithelialen Karzinomen des Kopf-Hals-Bereichs.

Die oralen Plattenepithelkarzinome wachsen dabei invasiv destruierend über die Basalmembran hinaus und metastasieren vorzugsweise lymphogen und hämatogen in Lymphknoten, Knochen, Gehirn, Leber oder die kontralaterale Körperhälfte. (Scully & Bagan, 2009)

Besonders in hohen Tumorstadien (T3 oder T4) und bei Lymphknotenbeteiligung (besonders auf Level IV) kommt es bei 4 bis 33 % der Patienten mit oralem Plattenepithelkarzinom zur Ausbildung von Fernmetastasen. (De Bree et al, 2000; Warner & Cox, 2003)

Eine vollständige Klärung des Prozesses der Metastasierung und der Invasion auf molekularer Ebene besteht bisher nicht.

Metastasen des oralen Plattenepithelkarzinoms können auf Basis bestimmter Merkmale klassifiziert werden.

Diese Einteilung erfolgt in Makrometastasen, die unter dem Lichtmikroskop erkennbar sind, und Mikrometastasen (< 2 mm), die bei der initialen Diagnostik leicht übersehen werden können. (Ferlito et al, 2008)

Als Lymphknotenmetastase wird bei einer krebserkrankten Person ein tastbarer Nodus beschrieben. Dabei erfolgt eine Einteilung in Entwicklungsstufen, wobei die intranodale Metastasierung unter die Stufen I bis IV gefasst wird und die Stufen V bis VII die extranodale Metastasierung beschreiben. (Wenzel & Koch, 2004)

Die Darstellung eines weiteren Unterschieds ist die Lokalisation der Metastase im Halsbereich. Dabei werden die Regionen des Halses in Level unterteilt, die in Tabelle 7 bereits definiert wurden. (Robbins et al, 2002)

## 1.4 Epithelial-mesenchymale Transition

Die EMT lässt sich in drei Subtypen unterteilen. (Kalluri & Weinberg, 2009)

Bei Typ 1 hat die EMT eine entscheidende Bedeutung für die Embryonalentwicklung, außerdem für die Organogenese und die Differenzierung des Neuralrohrs.



Bei Typ 2 ist die EMT an Entzündungs-, Wundheilungs- und Gewebedegenerationsvorgängen beteiligt. Um nach Trauma oder Infektion geschädigtes Gewebe zu ersetzen, induziert sie die Fibroblastenaktivierung.

Typ 3 kommt in neoplastischen Zellen vor. Diese invasieren, metastasieren und bilden die Voraussetzung für ein destruierendes Tumorwachstum, nachdem sie die Typ-3-EMT durchlaufen haben.

Bei Typ 3 findet ein Vorgang statt, bei dem sich Tumorzellen vom primären Karzinom trennen können, um in umliegende Strukturen und die Peripherie einzuwandern. (Thiery, 2002; Kalluri & Weinberg, 2009) Bei diesem Prozess erfolgt die Transformation von Epithelzellen in Zellen mit mesenchymalen Merkmalen; sie wird auch als *Phänotyptransition* bezeichnet. (Grünert et al, 2003; Thiery & Sleeman, 2006) Bei der EMT kommt es zur Reduktion der epithelialen und zur Steigerung der mesenchymalen Zellmerkmale, was der Zelle die Wanderung in entfernte Gewebe ermöglicht. (Voulgari & Pintzas, 2009) Die mesenchymalen Zellen sind zur gesteigerten Migration und Invasion befähigt und können als weiteres Malignitätsmerkmal eine Resistenz gegen Apoptose aufweisen. Demnach ist die EMT ein entscheidender Vorgang bei der Metastasierung.

Damit eine zirkulierende Zelle am Zielort als Metastase anwachsen kann, wird der umgekehrte Prozess nötig, die mesenchymale-epitheliale Transformation. (Thiery & Sleemann, 2006; Grünert et al, 2003)

Manche Karzinomzellen erhalten einen kompletten mesenchymalen Phänotyp, andere behalten einen Teil ihrer epithelialen Eigenschaften. Für die Karzinomentstehung sind die Angiogenese und die epitheliale Zellproliferation entscheidende Faktoren. (Hanahan & Weinberg, 2000)

In der Embryonalentwicklung senken ektodermale Zellen die Expression von epithelialen interzellulären Verbindungsmolekülen wie E-Cadherin und verlieren somit ihre epithelialen Merkmale. Dadurch wird es den Zellen möglich, die Basalmembran zu durchbrechen und in umgebende mesenchymale Strukturen auszuwandern. Dieser Vorgang findet ebenso bei der Metastasierung von Tumorzellen statt. Bisher ist ungeklärt, an welcher Stelle der Metastasierungskaskade die EMT von Bedeutung ist. Da an der Invasionsfront der

primären Karzinome Gene produziert werden, die mit der EMT assoziiert sind, wird angenommen, dass durch die Phänotyp-Änderung der Zellen ein Durchbruch der Basalmembran gelingt. (Brabletz et al, 2005) Eine weitere Möglichkeit wäre die Beteiligung der EMT am Intra- oder Extravasationsprozess. (Grünert et al, 2003) Die EMT aktivierend wirken transkriptionelle Repressoren wie die Transkriptionsfaktoren Snail, Slug, Twist sowie Goosecoid und das Forkhead-Box-Protein C2 (FOXC2) sowie Mitglieder der Familie der Zinkfinger-Homöodomänentranskriptionsfaktoren wie ZEB1 und ZEB2. (Hartwell et al, 2006; Kokudo et al, 2008; Mani et al, 2007; Medici et al, 2008; Shi & Massague, 2003; Thiery, 2002) Durch diese Transkriptionsfaktoren wird die Expression des membranassoziierten Anheftungsmoleküls E-Cadherin reduziert, gleichzeitig wird die Produktion von mesenchymalen Faktoren wie Vimentin gesteigert. E-Cadherin ist ein bedeutendes Merkmal des epithelialen Phänotyps (Spaderna et al, 2008; Yang & Weinberg, 2008), bei dessen Verlust es den Zellen erleichtert ist, in die EMT einzutreten und ein invasives Wachstum zu verfolgen. (Kim et al, 2002; Thiery, 2002)

Die Induktion der EMT in den unterschiedlichen Zellen ist zum einen abhängig von Signalmolekülen wie extrazellulär regulierten Kinasen (ERK), mitogenaktivierten Proteinkinase (MAPK), Phosphoinositid-3-Kinasen (PI3K), Akt, Smads, Ras homolog Family Member B (RhoB),  $\beta$ -Catenin, Lymphocyte Enhancer-binding Factor (LEF), Rat Sarcoma (Ras) und c-Fos, zum anderen von Zellmembranmolekülen, beispielsweise Integrinen wie  $\beta$ 4,  $\alpha$ 5 $\beta$ 1 und  $\alpha$ v $\beta$ 6. (Tse & Kalluri, 2007) Bei der EMT-Aktivierung hat der Verlust der Zell-Zell-Verbindungen und der Integrin-Interaktion mit der EZM eine große Bedeutung. (Gupta et al, 2005; Hartwell et al, 2006; Mani et al, 2008; Mani et al, 2007; Taki et al, 2006; Weinberg, 2008; Yang et al, 2006; Yang & Weinber, 2008) Der Transforming Growth Factor Beta (TGF- $\beta$ ) bindet an den TGF- $\beta$ -Rezeptor und aktiviert so die EMT. (Derynck et al, 2001) Eine zweite Möglichkeit erfolgt über die autokrine Aktivierung von TGF- $\beta$ , das p38-MAPK und RhoA aktiviert. Zuvor wurde TGF- $\beta$  durch  $\alpha$ v $\beta$ 6 aktiviert. (Bhowmick et al, 2001a und 2001b) Der TGF- $\beta$  aktiviert die Transkriptionsfaktoren Snail, Slug, SIP1 und E12, die zur Reduktion der E-Cadherin-Produktion führen. (Medici et al, 2008) Es wurde eine umgekehrte Korrelation zwischen der Expression von E-Cadherin und Snail sowie der Prognose von an einem Mamma- oder oralen Plattenepithelkarzinom Erkrankten gezeigt.

(Blanco et al, 2002; Yokoyama et al, 2001) Daraus resultiert, dass die Einleitung der EMT mit der Expression von Marker-Genen wie  $\alpha\beta6$ -Integrin in Zusammenhang gebracht werden kann; das Integrin  $\alpha\beta6$  stellt eine Verbindung der Karzinomzellen zu umgebenden Strukturen her und aktiviert Zellsignale wie TGF- $\beta$ .

In der vorliegenden Arbeit wird als Hypothese angenommen, dass bei der Invasion von epithelialen Karzinomzellen ins umgebende Gewebe an der Invasionsfront  $\alpha\beta6$  produziert wird. (Nieberler et al, 2017) Danach erfolgt die Intravasation der Tumorzellen in ein Blutgefäß, woraufhin die Zellen im Blutkreislauf zirkulieren. Gegenstand dieser Arbeit ist es daher, zu überprüfen, ob  $\beta6$ -mRNA, die für die  $\beta6$ -Untereinheit des epithelial assoziierten Integrin-Dimers  $\alpha\beta6$  kodiert, im Plasma der Erkrankten mit einem oralen Plattenepithelkarzinom nachzuweisen ist. Da Blut aus mesenchymalen Bestandteilen besteht, sollte  $\beta6$ -mRNA im Plasma gesunder Personen nicht vorzufinden sein. (Campbell & Reece, 2003) Sollte sich diese Arbeitshypothese bestätigen, könnte  $\beta6$ -mRNA in Zukunft als möglicher diagnostischer Tumor- und Verlaufsparemeter eingesetzt werden.

## 1.5 Zirkulierende Tumorzellen

Bereits 1869 beschrieb Ashworth die Existenz zirkulierender Tumorzellen (Circulating Tumor-Cells [CTC]) bei krebserkrankten Personen in seinen Publikationen über Untersuchungen mit dem Blut Verstorbener. (Ashworth, 1869) Diese Zellen wurden 1934 erstmals im Blut lebender erkrankter Personen nachgewiesen. (Pool & Dunlop, 1934)

Da die Tumorstreuung meist hämatogen stattfindet, steigt das Interesse an der Erforschung der CTCs – deren Bedeutung sowohl als potentieller Marker in der Tumorüberwachung als auch als therapeutischer Angriffspunkt wird zunehmend erkannt. (Plaks et al, 2013) Die CTCs beschreiben eine Zwischenstufe in der Tumorstreuung, weshalb in ihrer Analyse ein großes Potential als sogenannte Liquid-Biopsie bei Krebserkrankungen gesehen wird. Die Zellen hierfür können aus einer menschlichen Blutprobe isoliert werden, deren Gewinnung unkompliziert und gering invasiv ist. In einschlägigen Studien zur Entdeckung und Messung von CTCs wurde festgestellt, dass eine starke Assoziation zwischen hohen CTC-Leveln und einer Abnahme des progressionsfreien und des Gesamtüberlebens bei

Krebserkrankungen besteht. (Pantel & Alix-Panabières, 2013) Zirkulierende Tumormarker können möglicherweise als Vorhersageparameter in der individuellen Krebstherapie ihren Einsatz finden (Lianidou & Markou, 2011), außerdem können durch Mehrfachmessungen der CTCs die Prognose und die Behandlungseffizienz der Therapie überwacht werden. (Gorges & Pantel, 2013; Schwarzenbach et al, 2011) Die größte Bedeutung hat allerdings die Tatsache, dass CTCs noch vor Sicherung der Malignität des Tumors in entfernten Organen nachgewiesen wurden. (Rhim et al, 2012) Pro ml Serum sind 1 bis 7 Tumorzellen nachweisbar oder pro  $10^5$  bis  $10^6$  normaler Blutzellen eine Tumorzelle. (Garcia-Olmo et al, 2000) Durchschnittlich gehen bei Karzinomen zehn Zellen pro Gramm Tumorgewebe pro Tag in den Blutkreislauf über. (Carmeliet & Jain, 2000)

Diese geringen Mengen zeigen, dass das größte technische Problem in der Isolierung der Zellen aus dem Blut besteht. Bislang sind mehr als vierzig Methoden entwickelt worden, um zirkulierende Tumorzellen erfolgreich zu isolieren und somit auch zu charakterisieren. (Parkinson et al, 2012)

Ein geeignetes Screening-Verfahren ist hierbei von großer Bedeutung, da durch die Erkennung eines Malignoms in einem frühen Stadium der tödliche Verlauf der Erkrankung oftmals verhindert werden kann. Die Bestimmung von zirkulierenden Zellen in Körperflüssigkeiten, die mit dem Tumor assoziiert sind, dient inzwischen bei vielen Tumorerkrankungen als unkomplizierte Methode zur Frühdiagnostik. Oftmals ist nur eine Blutabnahme nötig, was die Akzeptanz bei den erkrankten Personen gegenüber aufwendigeren diagnostischen Methoden wie Röntgen oder MRT erhöht.

Bei Kopf-Hals-Karzinomen ist bisher keine geeignete Screening-Methode zum Nachweis oder zur Früherkennung der Krebserkrankung bekannt. (Kujan et al, 2006) Dabei steht das Ziel im Vordergrund, einen geeigneten Marker zu detektieren, der auch als Verlaufsparemeter eingesetzt werden kann, um ein Rezidiv zu erkennen oder die Tumorausdehnung zu prognostizieren. Ziel dieser Arbeit ist es, zu überprüfen, ob die Expression der  $\beta 6$ -mRNA des Integrin  $\alpha \nu \beta 6$  im Plasma der Erkrankten gegenüber Gesunden erhöht ist und ob sich eine Korrelation zu Parametern der Größe und Aggressivität des Tumors ergibt.

## 1.6 Integrin $\alpha\beta6$ als im Blut zirkulierender Tumormarker

Integrine gehören zur Gruppe der Zelloberflächenrezeptoren (Cell Adhesion Molecules (CAMs)) und spielen eine bedeutende Rolle sowohl bei den physiologischen Zell-Zell-Verbindungen als auch beim Kontakt zwischen Tumorzellen und den umgebenden Strukturen. Integrine treten mit Komponenten wie Fibronectin, Kollagen oder Laminin in Kontakt. Sie sind entweder Teil der EZM oder befinden sich in frei löslicher Form im Blutplasma. Eine Signalübermittlung – sowohl in der Zelle als auch außerhalb – wird durch diese Zellverbindungen über Integrine ermöglicht, wodurch ebendiese an Zellfunktionen wie Zellüberleben, Gewebedifferenzierung und -wachstum beteiligt sind. (Lock et al, 2008)

Integrine sind heterodimere Glykoproteine (135 Kilodalton (kD)) der Zellmembran, die aus je einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Untereinheit zusammengesetzt sind. Die beiden Untereinheiten sind über eine nichtkovalente Bindung miteinander verknüpft. Der kurze, ins Zytoplasma reichende Fortsatz der Integrine besteht aus circa vierzig Aminosäuren. (Van der Flier & Sonnenberg, 2001) Die Bindung erfolgt intrazellulär an einen Komplex aus Proteinen, beispielsweise Talin, Vinculin, Actinin und Filamin. (Critchley, 2000) Durch Integrinrezeptoren wird ein fokaler rezeptorvermittelter Kontakt zwischen den Aktinfasern des Zytoskeletts und der EZM geschaffen. Diese Verbindungen befinden sich in einem Prozess ständigen Umbaus und sind unter anderem für die Zellmigration notwendig. Für die fokalen Kontakte sind zum einen Konstruktionsproteine wie Filamin oder Vinculin, zum anderen Regulationsproteine wie die Focal Adhesion Kinase (FAK) von großer Bedeutung. (Petit & Thiery, 2000) Die Spezifität für bestimmte Bindungsstellen an der EZM wird durch unterschiedliche Kombinationen der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheit festgelegt. Integrine beeinflussen Prozesse wie Metastasierung und Angiogenese, Genexpression und Signalweiterleitung, Zellwachstum und -vermehrung, Proliferation der Apoptose und Gewebeinvasion. Daraus lässt sich folgern, dass sie eine bedeutende Funktion bei der Tumorentstehung einnehmen. (Varner & Cheresch, 1996)

Nur in physiologischer Verbindung zur EZM ist den Epithelzellen Teilung und Wachstum möglich; im Falle der Verbindungsunterbrechung zwischen Zelle und Matrix kommt es zur Anoikis, einem programmierten Zelluntergang, vergleichbar mit der Apoptose. (Frisch &

Francis, 1994) Die Wiederherstellung der Verbindung zur EZM und somit eine Resistenz gegen Anoikis kann durch Expressionsänderung von Oberflächenintegrinen realisiert werden. Aus diesen Vorgängen geht hervor, dass Integrine den Tumorzellen ein Überleben in einer unphysiologischen Umgebung ermöglichen, zum Beispiel im Blut.

Integrine kommen zwar ubiquitär im Körper vor, die Expression von  $\alpha\beta6$  ist allerdings auf epitheliale Gewebe begrenzt. Während  $\alpha\beta6$  in differenzierten epithelialen Geweben nur in geringen Mengen exprimiert wird, kann es innerhalb der Karzinogenese, aber auch bei Entzündungs- und Wundheilungsprozessen, überexprimiert vorgefunden werden. (Breuss et al, 1995)

Außer bei Mamma-, Lungen- und Kolonkarzinomen findet sich  $\alpha\beta6$  als das am häufigsten überexprimierte Integrin bei epithelialen Malignomen vor allem bei oralen Plattenepithelkarzinomen. (Arihiro et al, 2000; Smythe et al, 1995; Agrez, 1996; Breuss et al, 1995; Jones et al, 1997)

Die Fähigkeiten des  $\alpha\beta6$  entsprechen den sechs Änderungen der Zellphysiologie nach Hanahan und Weinberg: (Margadant & Sonnenberg, 2010)

- Selbstversorgung mit Wachstumsfaktoren: Induktion des TGF- $\beta$ 1-Signalwegs führt zur vermehrten Produktion von  $\alpha\beta6$  und dies wiederum zur erneuten Aktivierung von TGF- $\beta$ 1
- Resistenz gegenüber wachstumshemmenden Signalen und Umgehung der Apoptose: Signalweitergabe zwischen Zytosol und EZM sowie Hemmung der Apoptose
- Gewebeinvasion und Metastasierung: Zunahme von Migration und Invasion der Zellen durch Aktivierung von Matrix-Metalloproteinase 3/9 und Plasminogenaktivator Urokinase
- unbegrenzte Replikation: Aktivierung der Zellproliferation
- reduzierte Expression von E-Cadherin im Rahmen der EMT

Daraus lässt sich schließen, dass Tumorentstehung, Gewebeinvasion und Metastasierung durch die De-novo-Expression von  $\alpha\beta6$  beeinflusst werden.

## 1.7 Ziel dieser Arbeit und Fragestellung

Die Idee hinter dieser Arbeit ist es, im Blut zirkulierende Bestandteile herauszufiltern, die mit dem Tumor in der Mundhöhle assoziiert werden können. Hierzu wurde eine Blutprobe von 55 Personen mit einem bekannten oralen Plattenepithelkarzinom genommen, um im Plasma die mRNA der  $\beta 6$ -Untereinheit des Integrin  $\alpha v\beta 6$  zu detektieren. Dieses ist epithelialen Ursprungs. Da Blut aus Komponenten mesenchymalen Ursprungs besteht, wird das Vorkommen der mRNA der  $\beta 6$ -Untereinheit des Integrin  $\alpha v\beta 6$  physiologisch im Blut nicht erwartet. Gelingt die Isolation der mRNA der  $\beta 6$ -Untereinheit aus dem Plasma einer Blutprobe eines Erkrankten, könnte dies einen Hinweis auf den malignen Prozess im epithelialen Gewebe der Mundschleimhaut geben. Um aufzuzeigen, dass sich  $\alpha v\beta 6$  als potentieller Tumormarker eignet, soll überprüft werden, ob die  $\beta 6$ -mRNA des Integrin  $\alpha v\beta 6$  im Plasma mit dem Vorhandensein eines oralen Plattenepithelkarzinoms korreliert und ob dabei Rückschlüsse auf die Tumorausdehnung und damit die Prognose möglich sind. Eine erhöhte Expression von mRNA der  $\beta 6$ -Untereinheit des Integrin  $\alpha v\beta 6$  im Plasma des Bluts kann ein Hinweis darauf sein, ob eine Migration der Tumorzellen bereits stattgefunden hat und wie weit die Tumorausdehnung fortgeschritten ist.

Ziele der vorliegenden Doktorarbeit sind:

1. Nachweis der mRNA der  $\beta 6$ -Untereinheit des Integrin  $\alpha v\beta 6$  im Blutplasma der Erkrankten
2. Vergleich der Expressionslevel von mRNA der  $\beta 6$ -Untereinheit des Integrin  $\alpha v\beta 6$  im Blutplasma: Personen mit diagnostiziertem oralen Plattenepithelkarzinom gegenüber gesunden Personen
3. Überprüfung einer Korrelation des Expressionslevels von  $\beta 6$ -mRNA des Integrin  $\alpha v\beta 6$  mit der Größe des Tumors anhand der TNM-Klassifikation: gesonderte Betrachtung der Gruppen T, N, G und R
4. Unterschiede im Expressionslevel der mRNA der  $\beta 6$ -Untereinheit des Integrin  $\alpha v\beta 6$  im Blutplasma der Erkrankten in Korrelation zum AJCC-Stadium

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Verbrauchsmaterial

**Tabelle 9: Verbrauchsmaterial**

Pipettenspitzen 1–10 µl	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen 2–200 µl	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Cellstar-Tube 50 ml	Greiner GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Pipettenspitzen 50–1000 µl	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
2-Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol (EtOH)	Merck, Darmstadt, Deutschland
LightCycler®FastStart DNA Master SYBR Green I reaction mix	Roche, Mannheim, Deutschland
Proteinkinase K	Dako Deutschland, Hamburg, Deutschland
RNase-free DNase Set	Quiagen, Hilden, Deutschland
Rneasy®Protect Mini Kit	Quiagen, Hilden, Deutschland
SuperScript™ First Strand Synthesis System für Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Phosphat Buffered Saline (PBS), pH = 7,4	Gibco, Karlsruhe, Deutschland
Biocoll Separating Solution	Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland
RNAlater™, RNA Stabilization Reagent	Quiagen, Hilden, Deutschland
Wasserstoffperoxid 30 %; H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Merck, Darmstadt, Deutschland
Eppendorf-Tubes 1,5 ml	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Eppendorf-Tubes 2 ml	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Eppendorf-Mikroküvette	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
EDTA-Monovette®, Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) KE/9 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Safety-Multifly®-Kanüle 21G, 0,8 x 19 mm	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Venenstauer Jetpull®	Peil®, Bad Nauheim, Deutschland
Kodan-Spray, Hautdesinfektion farblos	Schülke & Mayr GmbH, Norderstedt Deutschland



Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH)	Quiagen, Hilden, Deutschland
Integrin $\alpha\beta6$ (ITG B6)	Quiagen, Hilden, Deutschland

### 2.1.2 Geräte

**Tabelle 10: Geräte**

BioPhotometer plus	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Eppendorf MiniSpin <sup>®</sup> plus	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Eppendorf Reference <sup>®</sup> Pipetten 0,5-10 $\mu$ l	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Eppendorf Reference <sup>®</sup> Pipetten 10-100 $\mu$ l	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Eppendorf Reference <sup>®</sup> Pipetten 100-1000 $\mu$ l	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
LightCycler <sup>®</sup> 1.0 Real-time Detection System Micra D-9	Roche, Mannheim, Deutschland
ThermoStat plus	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Eppendorf Centrifuge 5810R	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Vortexer Reax top (Vibrationsschüttler)	Heidolph Instruments GmbH, Schwabach, Deutschland

### 2.1.3 Kommerzielle Kits

**Tabelle 11: Kommerzielle Kits**

<b>Kit</b>	<b>Hersteller</b>
<b>RNase-free DNase Set</b> DNase I, RNase-frei (lipophilized) RDD-Puffer RNase-freies Wasser	Quiagen
<b>RNeasy Mini Kit</b> Sammelgefäße (1,5 und 2 ml) RLT-Puffer RW1-Puffer	Quiagen

<b>Kit</b>	<b>Hersteller</b>
RPE-Puffer (Konzentrat) RNase-freies Wasser	
<b>SuperScript First-Strand Synthesis System</b> 10 mM dNTP-Mix (Desoxyribonucleotid-Mix) Random Hexamers Diethylpyrocarbonat (DEPC)-treated Water (RNase-freies Wasser) 10 x RT buffer® (Reaktionspuffer) 25 mM MgCl <sub>2</sub> 0,1 M DTT RNase Out™ (RNase-Inhibitor) SuperScript™ II RT (Reverse Transkriptase)	Roche
<b>LightCycler®FastStart DNA Master SYBR Green I</b> LightCycler®FastStart Enzyme LightCycler®FastStart Reaction Mix SYBR Green MgCl <sub>2</sub> Stock Solution, 25 mM Water, PCR Grade	Roche

® Registrated trademark, ™ Trademark

Es wird keine Gewähr für die Angaben übernommen.

## 2.2 Methoden

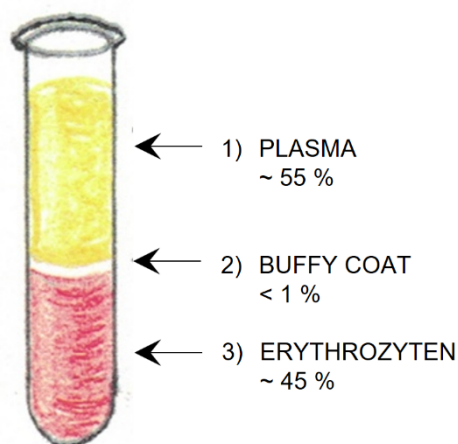
### 2.2.1 Patientenkollektiv

Es wurden 55 Personen in die Studie eingeschlossen, bei denen zuvor ein primäres Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle diagnostiziert worden war. Parallel und im Anschluss daran wurden 33 Blutproben von Gesunden inkludiert, um darzustellen, dass die mRNA der  $\beta 6$ -Untereinheit des Integrin  $\alpha v \beta 6$  im Blut der gesunden Personen in vergleichsweise geringerer Konzentration vorlag. Die Studie inkludiert nur volljährige Personen. Bei den erkrankten Studienteilnehmenden wurde im Zeitraum zwischen dem 01.09.2015 und dem 31.12.2016 an der Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie des Klinikums rechts der Isar der Technischen Universität eine operative Tumoresektion in Vollnarkose durchgeführt. Je nach Grunderkrankung und Tumorausdehnung erfolgten eine ein- oder beidseitige Lymphknotenausräumung im Halsbereich sowie eine primäre beziehungsweise sekundäre Rekonstruktion des resezierten Gewebes.

Die Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Technischen Universität München hat die klinische Studie genehmigt. Diese entspricht in der Durchführung den Regularien der Deklaration von Helsinki. Über ihre Teilnahme an der Untersuchung wurden die Studienteilnehmenden schriftlich und mündlich aufgeklärt. Die schriftliche Einverständniserklärung wurde von ihnen unterschrieben.

### 2.2.2 Probengewinnung

Es wurde am Tag vor dem operativen Eingriff bei jedem Erkrankten eine venöse Blutentnahme durchgeführt; die erkrankten Personen mussten hierfür nicht nüchtern sein. Das Blut wurde jeweils aus der Armvene entnommen und in entsprechenden Monovetten gesammelt. Es wurden hierfür EDTA-Röhrchen (Sarstedt Monovette<sup>®</sup>, Nümbrecht, Deutschland) mit einem Füllungsvolumen von 9 ml verwendet. Innerhalb von 60 Minuten nach der Blutentnahme wurden 9 ml Blut aus dem EDTA-Röhrchen zusammen mit 9 ml PBS-Lösung (Gibco, Karlsruhe, Deutschland) und 9 ml Biocoll Separating Solution (Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland) in ein Cellstar-Tube (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland) mit einem Füllungsvolumen von 50 ml gegeben. Dieser Mix wurde bei 20 °C für 15 Minuten in der Eppendorf-Zentrifuge 5810R (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) bei 900 g auf Programm 2 zentrifugiert. Nach der Zentrifugation befanden sich am Boden des Tubes die festen Blutbestandteile (Erythrozyten) und darüber das Blutplasma. An der Grenzschicht zwischen roten Blutkörperchen und dem Blutplasma befand sich der Buffy-Coat, der etwa 1 % der Blutprobe ausmacht. Er besteht hauptsächlich aus weißen Blutkörperchen und Blutplättchen (siehe Abbildung 2).



### Abbildung 2: Blutkomponenten nach der Zentrifugation

**1.** Plasma: Flüssige Bestandteile des Bluts aus Wasser, Mineralsalzen und Proteinen (55 %), **2.** Buffy-Coat: im Deutschen als Leukozytenfilm bezeichnete Grenzschiebt zwischen Erythrozyten und Blutplasma, bestehend aus Leukozyten und Thrombozyten (< 1 %), **3.** Erythrozyten (45 %)

Eigene Skizze,

angelehnt an: <https://de.wikipedia.org/wiki/Buffy-Coat>

Der Buffy-Coat wurde im Anschluss abpipettiert und in ein neues Cellstar-Tube gegeben. Dieses wurde bis zur 50-ml-Markierung mit PBS aufgefüllt und bei 4 °C für 5 Minuten bei 300 g auf Programm 6 erneut zentrifugiert. Am Boden des Tubes bildete sich ein kleines Zellpellet; dieses sollte erhalten bleiben, wobei die darauf liegende Flüssigkeit abgeschüttet wurde. Daraufhin wurde das Tube erneut bis 50 ml mit PBS-Lösung aufgefüllt und das Substrat wiederum bei 4 °C für 5 Minuten bei 300 g auf Programm 6 zentrifugiert. Die Flüssigkeit wurde entfernt, das Pellet pipettiert und mit 500 µl RNeasy Lysis Buffer (Quiagen, Hilden, Deutschland) sowie 500 µl PBS in einem Eppendorf-Röhrchen bei -80 °C im Gefrierschrank gelagert.

## 2.2.3 Isolation von Gesamt-RNA aus Zellen des Buffy-Coats

### 2.2.3.1 Grundlagen der RNA-Isolierung

Die eigentliche Isolation wurde unter Verwendung von Reaktionskits durchgeführt. Bei diesen handelt es sich um kommerziell vertriebene Kits, die die notwendigen Substanzen

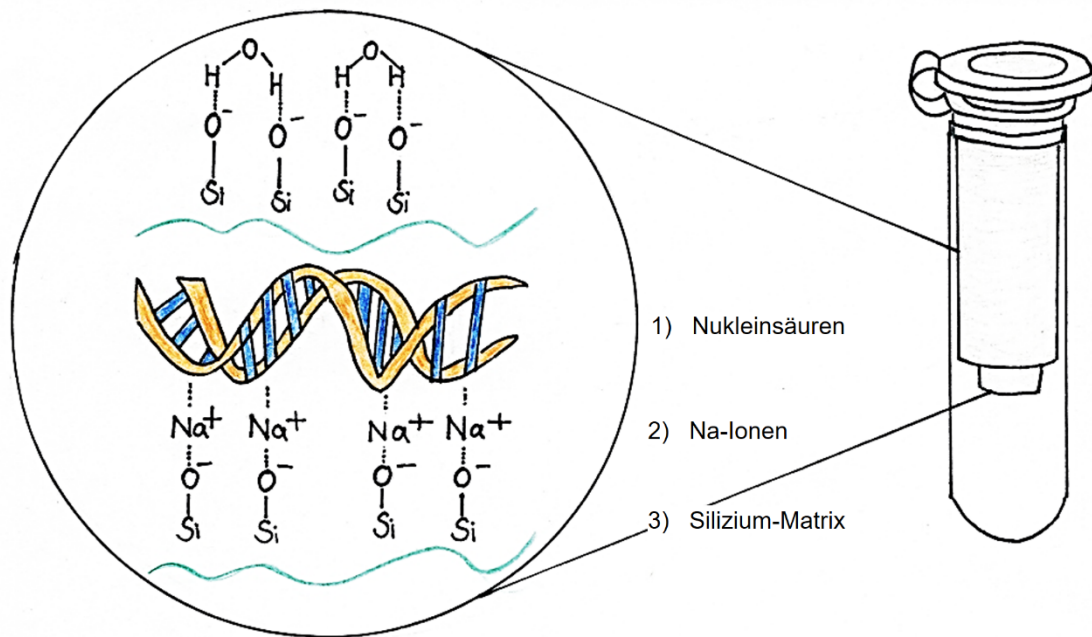
und Reagenzien für die RNA-Isolation, Komplementäre-DNA(cDNA)-Umschreibung und Polymerase-Kettenreaktion (PCR) beinhalten. Für die vorliegende Untersuchung wurden das Rneasy<sup>®</sup> Protect Mini Kit von Quiagen, das SuperScript First-Strand Synthesis System von Invitrogen und das LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I von Roche verwendet. Die Vorgehensweise wird im folgenden Abschnitt kurz erläutert.

Die RNA-Isolationsmethode besteht aus drei grundlegenden Schritten: Zunächst werden innerhalb der Zellyse zelluläre Bestandteile aufgetrennt. In einem zweiten Schritt werden zelluläre Nukleasen inaktiviert und in einem dritten Schritt erfolgt die Aufbrechung der zu isolierenden Nukleinsäuren.

Ein gebräuchliches Verfahren ist die Säulenchromatographie, die auch im Rahmen dieser Arbeit zur Anwendung kam. Sie wird im Folgenden kurz beschrieben.

### 2.2.3.2 Säulenchromatographie

Bei der Säulenchromatographie haften zu isolierende Nukleinsäuren an eine feste Matrix an. Das Problem der unvollständigen Phasentrennung wird umgangen. In der vorliegenden experimentellen Arbeit wurden Säulen verwendet, die die RNA durch eine Siliziummatrix binden, da die negativ geladenen Nukleinsäuren mit hoher Affinität an die positiv geladenen Siliziumpartikel binden (siehe Abbildung 3). Durch intensive Waschschriffe können die nun fest gebundenen Nukleinsäuren gereinigt werden. Im Anschluss findet die Elution der Nukleinsäuren mit destilliertem Wasser oder Tris-EDTA(TE)-Puffer statt. (Tan & Yiap, 2009)



**Abbildung 3: Säulenchromatographie**

1. Negativ geladene Nucleinsäuren: binden mit hoher Affinität an die positiv geladenen Siliziumpartikel, 2. Natriumionen: Funktion als Kationenbrücke, 3. Siliziummatrix

Eigene Skizze,  
angelehnt an: [https://en.wikipedia.org/wiki/Spin\\_column-based\\_nucleic\\_acid\\_purification](https://en.wikipedia.org/wiki/Spin_column-based_nucleic_acid_purification)

### 2.2.3.3 Ribonukleasen

Die als Einzelstrang vorliegende RNA reagiert besonders empfindlich gegenüber abbauenden Enzymen, den sogenannten Ribonukleasen (RNasen). In praktisch jeder lebendigen Zelle kommen RNasen vor, die RNA in ihrer endo- und exonukleolytischen Aktivität einschränken können. Die RNasen besitzen eine hohe Stabilität. Durch ihre Tertiärstruktur, die durch vier Disulfidbrücken stabilisiert wird, ist es dem Enzym nach Erhitzen oder Denaturieren möglich, schnell zu renaturieren. Außerdem benötigen RNasen kaum Cofaktoren und können in einem breiten pH-Bereich arbeiten. Die Denaturierung der RNA durch RNasen muss während und nach der Präparation vermieden werden, deshalb sollte die RNase-Aktivität limitiert werden. Es werden die extrinsische und die intrinsische RNase-Aktivität unterschieden. Erstere geht vor allem von äußeren Quellen der RNase-

Kontamination aus, beispielsweise von den Reagenzien selbst oder den Gerätschaften, aber auch von der menschlichen Haut oder dem Speichel. Bei der intrinsischen RNase-Aktivität wird die Kontamination von der Zelle selbst ausgelöst; intrazelluläre RNasen werden zum Beispiel bei der Lyse der Zellen freigesetzt.

Verschiedene Ribonukleaseinhibitoren wie Diethylpyrocarbonat (DEPC) werden benötigt, um die RNase-Aktivität zu verhindern. Zur Beeinträchtigung der RNase-Aktivität bindet DEPC kovalent an primäre und sekundäre Amine. Zu diesem Zweck werden Stammlösungen und Puffer mit dem RNase-Inhibitor DEPC versetzt. Das DEPC hat auch eine starke Bindung zum in der RNA enthaltenen Adenosin und kann dadurch zu einer chemischen Modifikation durch Carboxymethylierung von Adenylresten führen. Dadurch wird die Nutzungsfähigkeit der RNA für beispielsweise eine PCR eingeschränkt. Durch Erhitzen im Autoklav für 15 Minuten wird DEPC deshalb vor seinem Einsatz quantitativ zersetzt. (Farrell, 2009)

Mit der RNA in Berührung kommende Materialien müssen also vor dem Arbeiten mit der RNA autoklaviert oder mit RNase-Inhibitoren gereinigt werden. Alle Schritte in der RNA-Hood müssen daher mit Tragen von Handschuhen und Mundschutz durchgeführt werden und Sprechen während der Arbeitsschritte ist zu vermeiden. Durch Zugabe von 0,1 % DEPC (starker RNase-Inhibitor) kann das am Ende zur Aufnahme der RNA benötigte Wasser autoklaviert werden.

#### 2.2.3.4 Durchführung der RNA-Isolierung mit RNeasy® Protect Mini Kit

Die Isolierung erfolgte unter Verwendung des RNeasy® Protect Mini Kits (Quiagen, Hilden, Deutschland), das eine rasche Aufreinigung von RNA-Molekülen verspricht. Alle Schritte wurden, wie in Abbildung 4 dargestellt, laut Herstellerangaben durchgeführt.

Auf einer Silikon-Gel-Membran erfolgte die selektive Bindung von RNA. Ein spezielles Puffersystem ermöglicht die Anheftung von RNA mit einer Länge von über 200 Basenpaaren und einem Gewicht von bis zu 100 µg; vor allem die aus über 200 Basenpaaren bestehende mRNA wird herausgefiltert. Durch die Zugabe von Ethanol werden Kontaminationen effizient entfernt und es wird eine verbesserte Anhaftung der RNA an die Membran geschaffen. Alle Arbeitsschritte wurden während der RNA-Isolierung auf Eis durchgeführt.

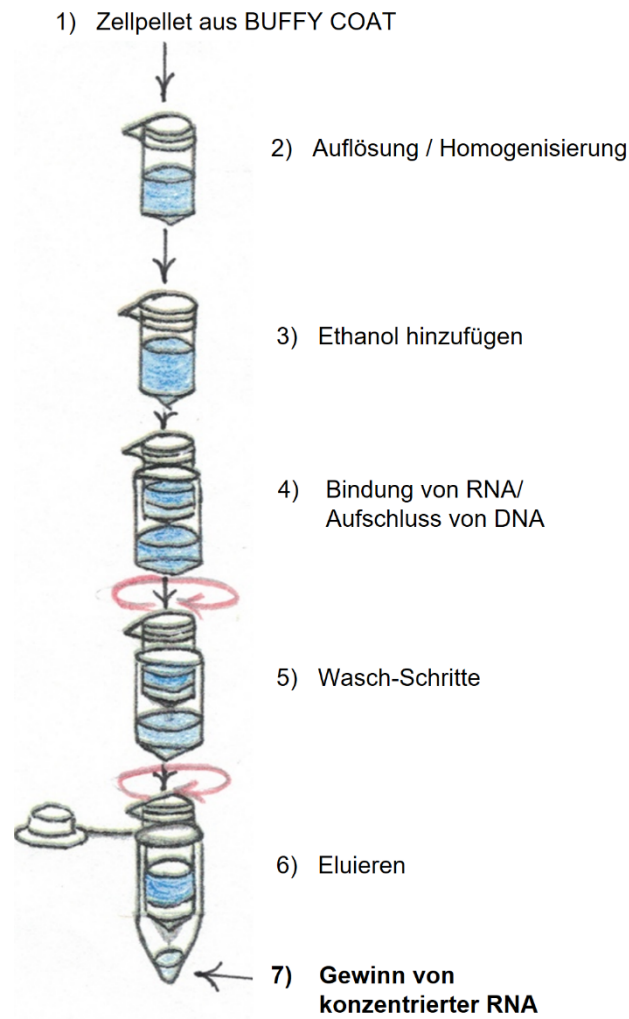
Nach der Entnahme der Proben aus der Lagerung bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  wurden diese sofort auf Eis gesetzt und langsam aufgetaut. Danach wurden die Proben in der Eppendorf MiniSpin plus (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) bei Raumtemperatur (RT) für 5 Minuten bei 2100 rpm zentrifugiert.

Nach der Zentrifugation wurde das Zellpellet am Boden des Eppendorf-Röhrchens behalten und das Medium abgesaugt. Der Probe wurden nun 350  $\mu\text{l}$  RLT-Puffer aus dem Rneasy<sup>®</sup>Protect Mini Kit zugegeben. Vor der ersten Nutzung wurden zu je 1 ml des RLT-Puffers 10  $\mu\text{l}$  2-Mercaptoethanol (Roth, Karlsruhe, Deutschland) hinzupipettiert. Hierbei verstärkt  $\beta$ -Mercaptoethanol den Zellaufschluss und führt zu einer zusätzlichen Inhibition der RNasen. Auf die 350  $\mu\text{l}$  RLT-Puffer wurden 350  $\mu\text{l}$  70-prozentiges EtOH (Merck, Darmstadt, Deutschland) gegeben und durch Pipettieren wurden die Flüssigkeiten vorsichtig vermischt. Nach kurzer Aufbereitung im Vortexmischer wurden 700  $\mu\text{l}$  jeder Probe auf eine Rneasy-Mini-Säule (aus dem Rneasy<sup>®</sup> Protect Mini Kit) überführt, die in einem 2-ml-Eppendorf-Collection-Tube platziert wurde. Im Anschluss wurde die Probe für 15 Sekunden auf 10 000 rpm zentrifugiert; die durchgelaufene Flüssigkeit (unten im Collection-Tube) wurde verworfen. Daraufhin wurden 350  $\mu\text{l}$  Buffer-RW1 in die Rneasy-column gegeben und bei RT 15 Sekunden bei 10 000 rpm zentrifugiert. Das entstandene Eluat wurde ebenfalls verworfen. Danach erfolgte der DNase-Verdau zur Beseitigung genomischer DNA. Dazu wurde der DNase-I-Incubation-Mix (80  $\mu\text{l}$ ) hergestellt, indem in einem neuen Eppendorf-Röhrchen 70  $\mu\text{l}$  RDD-Puffer aus dem RNase-free DNase Kit (Dako, Hamburg, Deutschland) mit 10  $\mu\text{l}$  DNase-I-Lösung (Sigma-Aldrich, München, Deutschland) vorsichtig durch leichtes Schwenken des Eppendorf-Tubes gemischt wurden. War die DNase-I-Lösung nicht vorrätig, musste sie vorher aufbereitet werden, indem 550  $\mu\text{l}$  RNase-freies  $\text{H}_2\text{O}$  in das Gefäß mit der DNase aus dem RNase-free DNase Set (Quiagen, Hilden, Deutschland) in Pulverform injiziert wurden. Das Gemisch wurde danach eine Minute lang gerollt. Die angebrochene DNase wurde gekennzeichnet und bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  im Kühlschrank gelagert. Der DNase-I-Incubation-Mix (80  $\mu\text{l}$ ) wurde direkt auf die Rneasy<sup>®</sup>Silica-Gel-Membran der Rneasy-column pipettiert und bei  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$  für 15 Minuten inkubiert. Anschließend wurden 350  $\mu\text{l}$  Waschpuffer-RW1 in die Rneasy-column gegeben und 15 Sekunden bei 10 000 rpm zentrifugiert. Nach Verwerfen des Unterstands erfolgten die Zugabe von je 500  $\mu\text{l}$  RPE-Puffer aus dem Rneasy<sup>®</sup> Protect Mini Kit und eine erneute Zentrifugation für



---

15 Sekunden bei 10 000 rpm. War das Buffer-RPE (aus dem Rneasy Mini Kit) noch ungeöffnet ist, musste es vor der ersten Verwendung gemäß Herstellerangaben mit 100 % EtOH verdünnt werden. Im letzten Waschschrift wurden erneut 500 µl RPE-Puffer hinzugegeben und es erfolgte die Zentrifugation der Proben für 2 Minuten bei 10 000 rpm, bevor die durchgelaufene Flüssigkeit und das Collection-Tube verworfen wurden. Die Rneasy-column wurde in ein neues Collection-Tube gestellt. Im Anschluss daran wurde bei voller Zentrifugengeschwindigkeit (circa 13 000 rpm) 60 Sekunden lang zentrifugiert, um die Rneasy-Membran zu trocknen. Zum Herauswaschen der RNA wurde die Rneasy-column in ein neues 1,5-ml-RNase-free-Collection-Tube gesetzt. Danach wurden 30 µl Rnase-free Water (aus dem Rneasy Protect Mini Kit) direkt auf die Rneasy-Membran pipettiert, 3 Minuten bei RT inkubiert und für 60 Sekunden bei 10 000 rpm zentrifugiert. Die Lösung aus dem Eppendorf-Röhrchen wurde schließlich erneut auf den Filter pipettiert und der Vorgang wurde wiederholt. Der komplette Prozess wird nochmals in Abbildung 4 veranschaulicht.



**Abbildung 4:** Prozedur RNeasy Mini Kit

1. Zellpellet aus Buffy-Coat, 2. Auflösung/Homogenisierung, 3. Ethanol hinzufügen, 4. Bindung von RNA/Aufschluss von DNA, 5. Waschschrte, 6. Eluieren, 7. Gewinn von konzentrierter RNA

Eigene Skizze,  
angelehnt an: [https://en.wikipedia.org/wiki/Spin\\_column-based\\_nucleic\\_acid\\_purification](https://en.wikipedia.org/wiki/Spin_column-based_nucleic_acid_purification)

### 2.2.3.5 Photometrische Messung des RNA-Gehalts

Von der durchgelaufenen Flüssigkeit (RNA-Solution) wurde 1  $\mu\text{l}$  mit 49  $\mu\text{l}$  PBS in eine Mikroküvette gegeben. Dabei ist eine Blasenbildung prinzipiell zu vermeiden. Gleichzeitig wurden 50  $\mu\text{l}$  PBS als Blindprobe separat pipettiert. Der Eppendorf-Bio-Photometer wurde

eingeschaltet und das Programm ssDNA ausgewählt. Zunächst wurde dann eine Leermessung mit 50  $\mu\text{l}$  PBS durchgeführt, bevor mit 49  $\mu\text{l}$  PBS plus 1  $\mu\text{l}$  RNA-Probe die eigentliche Sample-Messung erstellt wurde. Der RNA-Gehalt wurde im Photometer bestimmt, wobei der gemessene Wert in  $\mu\text{g}/\text{ml}$  angezeigt wurde und in  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  umgerechnet werden musste.

Die RNA wurde nun in entsprechend gekennzeichneten Tubes bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  längerfristig gelagert. Für den täglichen Gebrauch und bei zeitnaher Verwendung ist auch eine Lagerung bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  möglich.

## 2.2.4 Umschreibung der isolierten RNA in cDNA

### 2.2.4.1 Grundlagen der cDNA-Umschreibung

Damit die isolierte RNA für eine PCR verwendet werden kann, muss sie in cDNA umgeschrieben werden. Mit Hilfe von cDNA können Gene isoliert und charakterisiert werden. Dazu wird ein Enzym, die reverse Transkriptase (RT), verwendet, mit dem bei der In-vitro-Synthese der Poly-A-Schwanz der mRNA genutzt wird, um diese mit Hilfe eines sogenannten Oligo-dT-Primers in cDNA umzuschreiben. Nach Auflösen des RNA-DNA-Doppelstrangs kann der entstandene cDNA-Einzelstrang in eine Doppelstrang-DNA überführt werden. Eine cDNA enthält weder Promotoren noch Introns, sondern nur den transkribierten Bereich eines Gens. (Nordheim & Knippers, 2001)

### 2.2.4.2 Durchführung der cDNA-Umschreibung mit SuperScript™ First-Strand Synthesis System für RT-PCR

Die gewonnene RNA wurde mit Hilfe des SuperScript™ First Strand Synthesis Systems für RT-PCR (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) in cDNA umgeschrieben. Mit dem SuperScript™ First Strand Synthesis System kann aus gereinigter Poly-(A)-RNA oder aus kompletter RNA (enthält auch Transfer-RNA (tRNA) und ribosomale RNA (rRNA)) Einzelstrang-cDNA hergestellt werden. Nach der Synthese kann die cDNA mit Hilfe spezieller Primer im Rahmen einer PCR amplifiziert werden. Die Einzelstrang-cDNA-Synthese-Reaktion wird von SuperScriptII-Reverse-Transkriptase katalysiert. Die RNase-H-Aktivität, die die mRNA während der Einzelstrangreaktion herabsetzt, wird durch das Enzym

SuperScriptII reduziert. Die Wirkung von SuperScriptII-RT wird unwesentlich von rRNA oder tRNA beeinflusst, weshalb das Enzym genutzt werden kann, um die Synthese von cDNA aus kompletter RNA durchzuführen. Es verfügt über eine hohe thermische Stabilität und kann Temperaturen über 50 °C ausgesetzt werden.

Nach der Entnahme der RNA-Lösung aus der Lagerung bei -80 °C wurde diese auf Eis gestellt und langsam aufgetaut.

Die RNA- beziehungsweise Primer-Lösung wurde nach Herstellerangaben in RNase-freien 1,5-ml-Tubes vermischt (siehe Tabelle 12). Jede Komponente wurde vor Gebrauch kurz gemischt und zentrifugiert. Die benötigte Menge für 1 µg RNA kann prinzipiell nach photometrischer Bestimmung der Konzentration der gewonnenen RNA berechnet werden; 1 µg RNA wurde diesbezüglich durch den ermittelten photometrischen Wert dividiert.

Beispiel:

$1\mu\text{g} / 1,6\mu\text{g}/\mu\text{l} = 0,625\mu\text{l} \rightarrow$  Dieser Wert wurde dann für Sample 1 1 µg RNA verwendet.

**Tabelle 12: RNA-/Primer-Mischungsverhältnisse**

<b>Komponente</b>	<b>Probe</b>	<b>No-RT-Kontrolle</b>	<b>RNA-Kontrolle</b>
RNA-Probe (1 µg)	x µl	x µl	-
Kontroll-RNA	-	-	1 µl
10 mM dNTP-Mix	1 µl	1 µl	1 µl
Random Hexamer	1 µl	1–5 µl	1–5 µl
DEPC-treated Water	bis 10 µl auffüllen	bis 10 µl auffüllen	bis 10 µl auffüllen

Maximal wurde die Menge von 8 µl RNA verwendet. Dabei wurde kein DEPC-behandeltes Wasser (DEPC-treated Water) beigelegt, da das Volumen dieser Probe bereits 10 µl betrug.

Bei 8 µl RNA wurde beispielsweise ein Ansatz, wie er in Tabelle 13 angeführt ist, für den Primer-Mix verwendet:

**Tabelle 13: RNA-/Primer-Mischungsverhältnisse bei 8 µg RNA**

<b>Komponente</b>	<b>Ansatz: 1 x</b>	<b>Ansatz: 3 x</b>
RNA	8 µl	24 µl
10 mM dNTP-Mix	1 µl	3 µl
Random Hexamer	1 µl	3 µl

Pro Probe wurde 1 µg RNA mit 1 µl dNTP-Mix sowie dem Primer, 1 µl Random Hexamers (50 ng/µl), zusammengegeben. Danach erfolgte die Auffüllung der Probe mit DEPC-treated Water bis 10 µl. Alle Komponenten wurden aus dem SuperScript™ First Strand Synthesis System für RT-PCR entnommen. Nachdem der Primer-Mix hergestellt worden war, erfolgte die Inkubation des Reaktionsansatzes für 5 Minuten bei 65 °C, bevor alle Röhren wenigstens eine Minute auf Eis gestellt wurden.

Danach wurde der Master-Mix hergestellt (siehe Tabelle 14). Pro Ansatz wurden dafür je 2 µl 10 x RT-Buffer, je 4 µl 25 nM Magnesiumchlorid (MgCl<sub>2</sub>), je 2 µl 0,1 M 1,4 Dithiothreitol (DTT) und je 1 µl RNase OUT™ verwendet. Alle Komponenten wurden in einem Eppendorf-Röhren zum Reaktions-Mix zusammengefügt und dem SuperScript™ First Strand Synthesis System für RT-PCR entnommen. Dabei wurde immer 0,5-fach mehr Reaktions-Mix hergestellt, um genügend Reserve zu erhalten.

**Tabelle 14: Master-Mix-Mischungsverhältnisse**

<b>Komponente</b>	<b>Ansatz: 1 x</b>	<b>Ansatz: 2,5 x</b>
10 x RT-Buffer	2 µl	5 µl
25 nM MgCl <sub>2</sub>	4 µl	10 µl
0,1 M DTT	2 µl	5 µl
RNaseOUT	1 µl	2,5 µl

Um die Menge des benötigten Reaktions-Mix zu berechnen, wurde folgende Formel verwendet:

Formel für Reaktions-Mix:  $\text{Ansatz} \times (\text{Probenzahl} + 0,5) \cdot \mu\text{l der Komponente}$

Pro Einfachansatz des RNA-Primer-Mix wurden 9  $\mu\text{l}$  Master-Mix zugegeben. Der Inhalt der Eppendorf-Röhrchen wurde gemischt und anschließend kurz zentrifugiert. Danach wurde der Ansatz bei 25 °C für 2 Minuten inkubiert und 1  $\mu\text{l}$  Super-Script-II-RT (50U/ $\mu\text{l}$ ) aus dem SuperScript™ First Strand Synthesis System für RT-PCR wurde je Tube hinzugefügt. Bei einer Nachbestellung liegt SS II in 4-facher Konzentration (200 U/ $\mu\text{l}$ ) vor, dementsprechend wurde eine 1:4-Verdünnung durchgeführt. Das heißt, dass 0,25  $\mu\text{l}$  statt 1  $\mu\text{l}$  Super-Script II zugegeben wurden. Es erfolgte eine erneute Inkubation bei 25 °C für 10 Minuten, danach bei 42 °C für 50 Minuten und schließlich bei 70 °C für 15 Minuten. Im Anschluss wurden die Röhrchen wiederum zentrifugiert, um danach 1  $\mu\text{l}$  RNase H je Tube zu pipettieren. Abschließend wurde die Inkubation bei 37 °C für 20 Minuten fortgesetzt. Die Proben wurden bei -20 °C bis zur Weiterverwendung der cDNA gelagert.

Zusammenfassend besteht die cDNA-Umschreibung damit aus vier Schritten:

1. Denaturierung: 1 bis 8  $\mu\text{l}$  RNA, 0 bis 7  $\mu\text{l}$  DEPC-Wasser und 1  $\mu\text{l}$  Random Hexamer werden 5 Minuten bei 65 °C inkubiert und anschließend eine Minute auf Eis gelagert.
2. Annealing: nach Pipettieren des Master-Mix Inkubation bei RT für 2 Minuten
3. cDNA-Synthese: zunächst Inkubation bei RT für 10 Minuten, dann bei 42 °C für 50 Minuten
4. Schlussreaktion: Beenden der Reaktion bei 70 °C für 15 Minuten

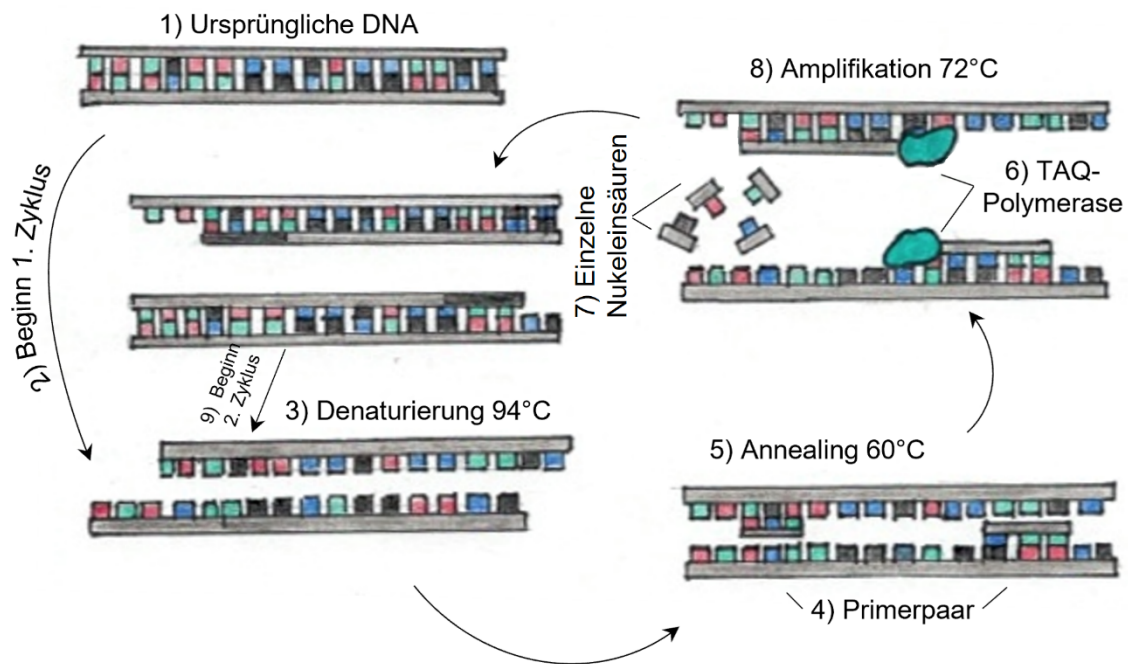
## 2.2.5 Polymerase Kettenreaktion

### 2.2.5.1 Grundlagen der Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Bei der PCR werden definierte DNA-Abschnitte enzymatisch amplifiziert. Für einen Reaktionsansatz wird Folgendes benötigt:

- amplifizierende DNA
- Nukleotid-Mix: dient als Substrat
- zwei Primer: hier GAPDH und ITG B6
- DNA-Polymerase: hier die TAQ-Polymerase

Die gezielte Vermehrung spezifischer DNA-Abschnitte aus einem Gemisch von DNA-Molekülen wird durch die Methode der PCR ermöglicht. Die Primer flankieren eine Nukleotidsequenz auf dem Sense-Strang und eine andere auf dem Antisense-Strang des zu amplifizierenden DNA-Abschnitts. Erst nach erfolgter Anhaftung der Primer beginnt die Replikation durch die zugegebene DNA-Polymerase, indem diese die Stränge mit freien Nukleotiden auffüllt (Elongation). Die Primer entsprechen der Komplementärsequenz, sodass ihre Anlagerung an der gewünschten Stelle der DNA ermöglicht wird. Die Denaturierung wird bei Temperaturen um 95 °C erreicht, wobei es zur Auftrennung der beiden DNA-Stränge kommt. Erst danach ist die Anlagerung möglich. Meist werden 30 bis 40 Zyklen von Denaturierung, Annealing und Elongation durchgeführt. Die einzelnen Schritte müssen bei unterschiedlichen Temperaturen erfolgen. Dazu wird eine hitzestabile DNA-Polymerase benötigt, die für ihre Arbeit Nukleotide und Magnesiumionen erfordert. Die PCR findet im Thermocycler statt – mit diesem Gerät ist eine exakte Temperaturregulierung möglich. Das Prinzip der Vervielfältigung von DNA-Abschnitten durch PCR ist in Abbildung 5 dargestellt.



**Abbildung 5: PCR-Zyklus**

1. Ursprüngliche DNA, 2. Beginn erster Zyklus, 3. Denaturierung bei 94 °C, 4. Primerpaare, 5. Annealing bei 60 °C, 6. TAQ-Polymerase, 7. Einzelne Nucleinsäuren, 8. Amplifikation bei 72 °C, 9. Beginn zweiter Zyklus

Eigene Skizze,

angelehnt an: <https://www.uni-bielefeld.de/teutolab/fachorientiert/bio-technologie/Arbeitsmaterial/PCR-Zyklus>

### 2.2.5.2 Weiterentwicklung zur quantitativen Real-Time-RT-PCR: Umstellen der PCR auf SYBR Green und Real Time

Unter einer RT-PCR wird die Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion verstanden. Hinsichtlich der Durchführung einer RT-PCR wird zwischen zwei Vorgehensweisen unterschieden: Two-Step-RT-PCR und One-Step-RT-PCR. In dieser Arbeit wurde die Two-Step-RT-PCR angewendet. Dabei wird zuerst die cDNA-Erststrangsynthese mit RNA als Template durchgeführt. Dieser Vorgang wurde bereits unter Punkt 2.2.4.2 im Detail beschrieben. Eine Probe der reversen Transkription wird dann einer nachfolgenden PCR zugeführt, sodass die neu gebildete cDNA als Template dient. Somit ergeben sich zwei



separate Reaktionen, wobei jeweils die Umgebungsbedingungen optimal an die eingesetzten Enzyme angepasst werden können.

Das Prinzip der Real-Time-PCR entspricht im Wesentlichen der exponentiellen DNA-Vervielfältigung der konventionellen PCR. Thermocycler ermöglichen eine Real-Time-PCR oder eine Real-Time-RT-PCR. Die PCR-Produkte können direkt bei ihrer Bildung in Echtzeit erfasst werden. Es existieren mehrere Optionen, um die Produkte während der Reaktion zu kennzeichnen. Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte die Markierung mit Hilfe des DNA-bindenden Fluoreszenzfarbstoffs SYBR Green I. In Kombination mit SYBR Green I und einem entsprechenden Reagenz können kostengünstige, unmodifizierte Primer-Paare eingesetzt werden, wodurch eine schnelle und preiswerte Assay-Entwicklung möglich wird. In einer Standard-PCR sollte vorher überprüft werden, wie spezifisch die unmodifizierten Primer-Paare binden. Durch dieses Verfahren wird eine genaue Messung der Ausgangs- oder Zielnukleinsäure ermöglicht. Die Bestimmung der Fluoreszenz erfolgt in jedem durchlaufenen Zyklus; dabei verhält sich die Intensität der Fluoreszenz proportional zur PCR-Produktmenge. So können Rückschlüsse auf die Menge der Zielnukleinsäure gezogen werden. Die Messung und die Auswertung der mRNA-Expressionslevel erfolgten mit dem LightCycler von Roche mit einem Temperaturprofil sowie anschließender Schmelzkurvenanalyse des Amplifikats zur Überprüfung der Spezifität der PCR-Produkte.

In der quantitativen Real-Time-PCR wird zwischen der absoluten und der relativen Form unterschieden. Während bei der absoluten Quantifizierung die Messung der tatsächlichen Menge des Zielgens erfolgt, wird bei der relativen Quantifizierung die Zielsequenz zu einer Referenzsequenz zahlenmäßig ins Verhältnis gesetzt, beispielsweise zu einem Housekeeping-Gen.

### 2.2.5.3 Relative Quantifizierung

Die Beurteilung des Verhältnisses der Zielgene zur Anzahl von endogenen Referenztranskripten ist Gegenstand der relativen Quantifizierung. In dieser Arbeit wurde eine relative Quantifizierung angewendet. Ein Gen-Transkript, dessen Signal einen Ausgleich in der Variation der Ausgangsmenge der eingesetzten RNA schaffen kann, ermöglicht eine interne Kontrolle. Hierfür werden beispielsweise Haushaltsgene wie GAPDH, Actin oder Tubulin

eingesetzt, die in allen Proben zu gleichen Anteilen enthalten sind. Die Vervielfältigung von Ziel- und Referenzmolekül erfolgte aus der gleichen Probe. Danach wurde die Menge des Referenzmoleküls zum zu untersuchenden Gen ins Verhältnis gesetzt. Ein solcher Mengenvergleich erlaubt die Beurteilung der Expressionsänderung des Zielgens. Die relative Quantifizierung ist allerdings nur möglich, wenn die Expression des Housekeeping-Gens trotz unterschiedlicher Gewebearten und Umgebungsbedingungen konstant bleibt. (Jansohn & Rothhämel, 2012)

*Normierung* beschreibt den Mengenvergleich mit den Haushaltsgenen. Die Wahl der geeigneten internen Kontrolle ist hierbei von großer Bedeutung, da die Gesamtauswertung auf diesem Signal beruht. (Lehmusvuori, 2013)

#### 2.2.5.4 Herstellung von Standards

Mittels externer Standards erfolgt die absolute Quantifizierung von Transkriptmengen eines Gens. Als Standardreihen können Verdünnungsreihen von In-vitro-Transkripten fungieren, die in der Regel aus fünf Stufen bestehen. Die Durchführung einer Vervielfältigung von Standards und der zu quantifizierenden Ziel-Nukleinsäure in getrennten Reaktionen ist hierbei eine Voraussetzung. Danach erfolgt die Festlegung der entsprechenden Werte des Cycle-Thresholds (Ct) (Schwellenwert-Zyklus) für die Standards und die unbekanntes Proben. Durch die Ct-Werte und die erstellten Standardkurven kann dann die ursprüngliche Menge der Transkripte berechnet werden. Die Zyklusanzahl, die notwendig ist, um einen zuvor definierten Grenzwert im Signal der vervielfältigten DNA zu überschreiten, wird als *Ct-Wert* bezeichnet (Jansohn & Rothhämel, 2012) Für verwendete Primer und das GAPDH wurden Standard-Verdünnungsreihen gebildet. Nach Herstellerangaben wurden die Proben mit Hilfe des Rneasy<sup>®</sup> Protect Mini Kit (Quiagen, Hilden, Deutschland), des RNase-free DNase Kit (Dako, Hamburg, Deutschland), der Proteinkinase K (Dako, Hamburg, Deutschland) und dem SuperScript<sup>™</sup> First Strand Synthesis System für RT-PCR (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) behandelt. Im Anschluss erfolgte die photometrische Bestimmung der DNA-Konzentration. Standardkurven wurden aus den Verdünnungsreihen von 1:100 bis 1:100 000 produziert.

### 2.2.5.5 Durchführung qRT-PCR mit LightCycler® 1.0 Real-Time Detection System

Die qRT-PCR wurde mit dem LightCycler®1.0 Real-Time Detection System (Roche, Mannheim, Deutschland) durchgeführt. Vorbereitend für die PCR wurde der Arbeitsplatz für 15 bis 20 Minuten mit UV-Licht bestrahlt, um eine mögliche DNA-Kontamination zu vermeiden. Währenddessen wurde überprüft, ob alle Reagenzien in ausreichender Menge für die PCR vorhanden sind. Eventuell muss dabei SYBR-Green neu angesetzt werden. Dazu werden 10 µl aus 1a (enthält Polymerase) zum kompletten Inhalt von 1b (enthält einen Mix aus dNTPs und Puffer) pipettiert und vorsichtig gemischt. Die cDNA der Proben und die benötigten Komponenten wurden aus der Lagerung bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  entnommen und auf Eis langsam aufgetaut, die Reagenzien und Proben wurden während des Arbeitens dunkel auf Eis gelagert. Der Master-Mix wurde nach dem Ansatz in Tabelle 15 für das Ziel-Gen  $\beta 6$ , das Haushaltsgen GAPDH und die Kontrollen zubereitet. Hierzu wurden je nach Reaktionsansatz LightCycler® FastStart DNA Master SYBR Green I (Roche, Mannheim, Deutschland), GAPDH, Forward und Reserve Primer (0,5 mM),  $\text{MgCl}_2$  sowie RNase-freies Wasser zu einem Gesamtvolumen von 18 µl vermischt. Die PCR-Ansätze wurden in drei Eppendorf-Röhrchen hergestellt, die Komponenten wurden entsprechend der in Tabelle 15 aufgeführten Reihenfolge zugegeben.

**Tabelle 15: Master-Mix mit ITG B6, GAPDH und Primer A/B**

1 x je Ansatz	Master-Mix für Kontrollen in µl	Master-Mix ITG B6 in µl	Master-Mix GAPDH in µl
H <sub>2</sub> O	12,4	13,4	13,4
MgCl <sub>2</sub>	1,6	1,6	1,6
Human ITG B6	1	1	-
Human GAPDH	-	-	1
Primer A	1	-	-
Primer B	1	-	-
SYBR-Green	2	2	2
Gesamtvolumen	18	18	18

Das anzusetzende Volumen wurde berechnet, indem die einzelnen Mengenangaben mit der erforderlichen Anzahl der Proben multipliziert wurden. Zudem wurde jeweils eine Reserve addiert. Danach wurden die Glaskapillaren mit einer Pinzette im Zentrifugen-Adapter bei Nummer 1 beginnend in aufsteigender Reihenfolge platziert, der Adapter wurde vorher im Kühlschrank gelagert. Dabei war darauf zu achten, dass sich dieser während des Pipettierens nicht auf RT erwärmt. Von dem Ansatz wurden 18  $\mu\text{l}$  in jede Kapillare pipettiert (nach circa 8-mal Pipettieren wurde die Pipettenspitze gewechselt). Danach wurden 2  $\mu\text{l}$  cDNA der asservierten Probe hinzupipettiert, was ein Endvolumen von 20  $\mu\text{l}$  pro Probe ergab. Von den Standardproben wurden 2  $\mu\text{l}$  in die Kapillaren 1 bis 4 pipettiert und diese wurden sofort mit dem entsprechenden Stopfen verschlossen. Nach den Standards ab Nummer 5 wurden die darauffolgenden Kapillaren mit dem ITG B6-Master-Mix befüllt. Pro Probe wurden jeweils zwei Kapillaren befüllt, danach wurden wieder zwei pro Probe mit dem GAPDH-Master-Mix versehen. Die letzten drei Kapillaren wurden mit 18  $\mu\text{l}$  Master-Mix befüllt, in die No-Template-Control-Kapillare wurden zusätzlich anstelle der cDNA 2  $\mu\text{l}$  H<sub>2</sub>O pipettiert. In die Negativkontrolle wurde nichts weiter pipettiert und in die Positivkontrolle wurden 2  $\mu\text{l}$  einer beliebigen Probe gegeben. Immer direkt nach dem Befüllen wurden die Glaskapillaren mit dem entsprechenden Stöpsel durch Verwendung einer Pinzette verschlossen. Die Glaskapillaren wurden in der Tischzentrifuge (Eppendorf) bei 3000 rpm für 15 Sekunden zentrifugiert, damit sich die Proben nach unten absenken konnten. Danach wurden LightCycler, Computer und Drucker eingeschaltet. Die Glaskapillaren wurden vorsichtig bei Nummer 1 beginnend und ohne einen Platz freizulassen ins Karussell des LightCyclers transferiert. Dabei wurde kontrolliert, ob der Füllungsstand aller Kapillaren identisch war und die Negativkontrolle einen niedrigeren Füllungsstand aufwies. Das Karussell wurde nun in den LightCycler eingesetzt, wobei das hörbare Einrasten sichergestellt werden musste. Am Computer wurde das Programm *LightCycler 3Front Screen* geöffnet und auf *Run* eingestellt. Danach wurden *open experiment file* und *start selftest* ausgewählt. Unter *edit sample* wurden die maximale Besetzung und die einzelnen Proben eingetragen und zum Schluss wurde das Programm durch die Eingabe von *sample done* nach dem Algorithmus in Tabelle 16 gestartet.

**Tabelle 16: Algorithmus der qRT-PCR**

<b>Prozess</b>	<b>Zeit in Sekunden</b>	<b>Temperatur in °C</b>	<b>Zyklen</b>
Enzyminduktion	600	95	1
Denaturierung	15	94	
Annealing	10	60	40
Amplifikation	10	72	
Schmelzkurvenanalyse	15	65	20
Abkühlung	30	40	1

Am Ende jeder Vervielfältigung erfolgte die Aufzeichnung von Schmelzkurven, um die Regelmäßigkeit der cDNA-Fragmente zu kontrollieren. Nach jedem Annealing wurde die Fluoreszenz bestimmt und es fand ein Vergleich der gemessenen Werte mit einer Referenzkurve statt. Bei jeder Probe wurde das Haushaltsgen GAPDH zur Normierung aufgezeichnet. Außerdem wurden jeweils vier cDNA-Standards einer davor hergestellten Verdünnungsreihe mitbestimmt. Mit Hilfe der Standardkurven erfolgte die relative Quantifizierung. Eine Negativ- und eine Positivkontrolle sowie eine No-Template-Control wurden als weitere Proben mitbestimmt. Es wurde eine Zweifachbestimmung der Proben durchgeführt.

### 2.2.6 Statistische Auswertung

Mit Hilfe des statistischen Programmpakets IBM SPSS Statistics (Version 26.0; IBM, Armonk, USA) wurde der statistische Bericht erstellt und ausgewertet. Mittelwert, Standardabweichung (SD), Median, Minima und Maxima wurden für die deskriptive Statistik berechnet. Tests zur statistischen Signifikanz wurden vorgenommen und entsprechend gekennzeichnet. Alle p-Werte sind zweiseitig. Um die statistischen Signifikanzunterschiede anzugeben, wurde der p-Wert von  $< 0,05$  eingeführt.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Daten der erkrankten Personen

#### 3.1.1 Geschlecht der erkrankten Personen

In Tabelle 17 ist die geschlechtliche Verteilung in der Gruppe der erkrankten und gesunden Personen beschrieben. Werden die 55 erkrankten Personen betrachtet, die in der Studie inkludiert waren, waren mehr Männer betroffen – insgesamt waren 60 % der Erkrankten männlich, 40 % waren weiblich.

In der Gruppe der Gesunden, die 33 Personen umfasste, war die Geschlechterverteilung gegenläufig: Nur 36,4 % der nicht erkrankten Personen waren Männer, hingegen 63,3 % Frauen.

**Tabelle 17: Geschlechterverteilung in der Gruppe der erkrankten und gesunden Personen**

<b>Gruppe</b>	<b>männlich</b>	<b>weiblich</b>	<b>Gesamt</b>
Erkrankte	33	22	55
% in Gruppe	60,0 %	40,0 %	100,0 %
Gesunde	12	21	33
% in Gruppe	36,4 %	63,6 %	100,0 %
Gesamt	45	43	88
% in Gruppe	51,5 %	48,9 %	100,0 %

#### 3.1.2 Alter der erkrankten Personen

Wird die Gruppe der 55 erkrankten Personen bezüglich des Alters beurteilt (siehe Tabelle 18), ergibt sich ein mittleres Erkrankungsalter von 63,05 Jahren mit einem Häufigkeitsgipfel bei 64 Jahren. Die jüngste betroffene Person war 29 Jahre, die älteste 88 Jahre alt.

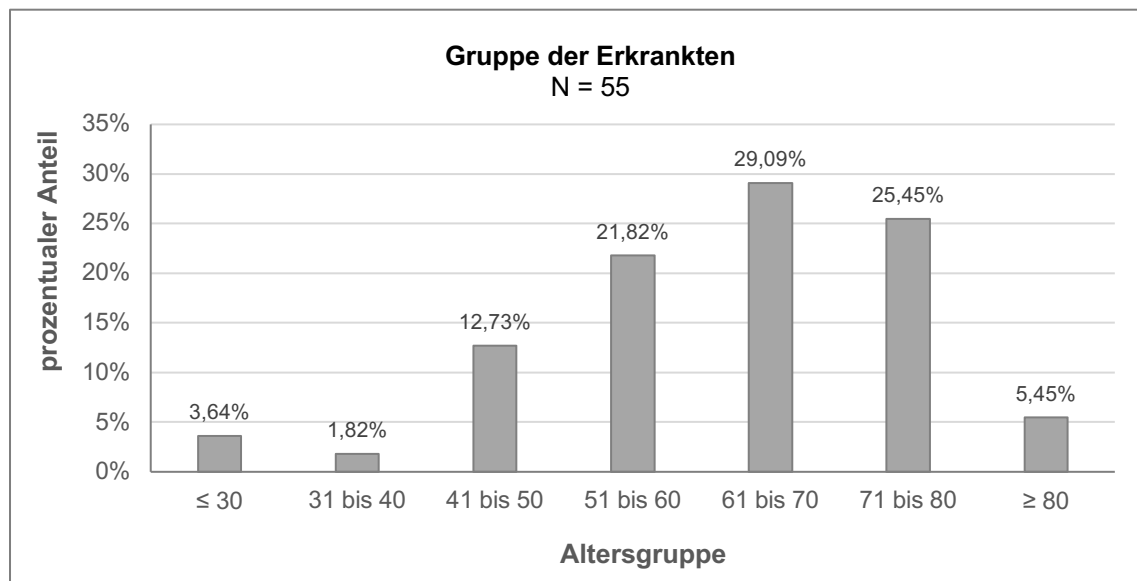
In der Kontrollgruppe mit 33 gesunden Personen betrug das durchschnittliche Alter 46,88 Jahre; am häufigsten kam die Altersgruppe um die 39 Jahre vor. Die SD war mit 18,493

bei den Gesunden gegenüber 13,362 bei den Erkrankten erhöht. In der Kontrollgruppe betrug das Alter der jüngsten Person 22 Jahre, die älteste Person hatte ein Alter von 80 Jahren.

**Tabelle 18: Altersverteilung in der Gruppe der erkrankten und gesunden Personen**

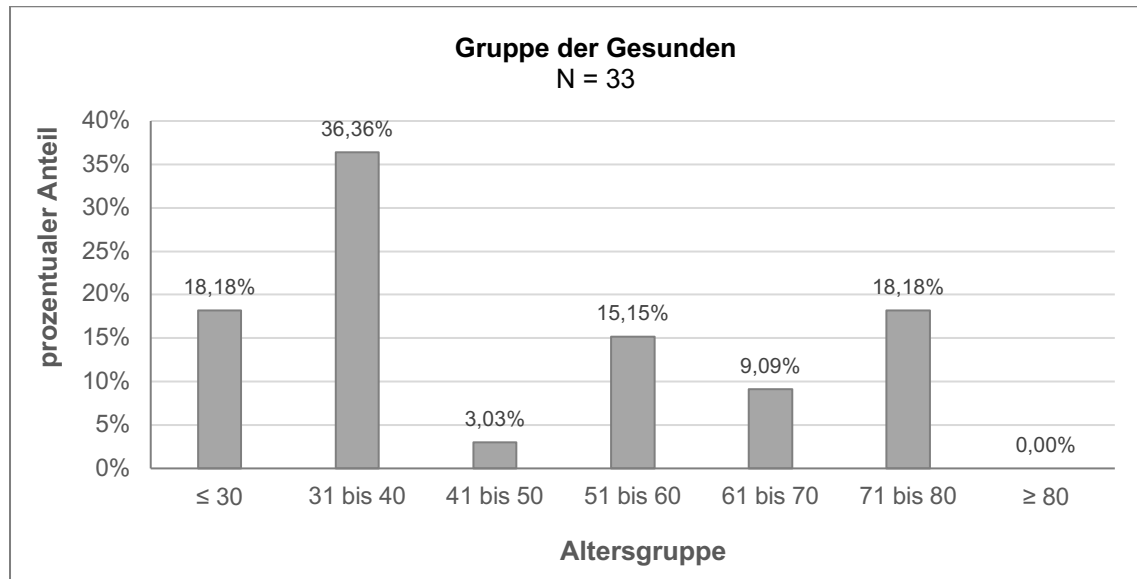
Gruppe	N	Mittelwert	SD	Median	Minimum	Maximum
Erkrankte	55	63,05	13,362	64,00	29	88
Gesunde	33	46,88	18,493	39,00	22	80
Insgesamt	88	56,99	17,281	60,00	22	88

Sowohl die Mittelwerte und Mediane als auch die Abbildungen 6, 7 und 8 zeigen auf, dass die erkrankten Personen durchschnittlich älter waren als die gesunden.



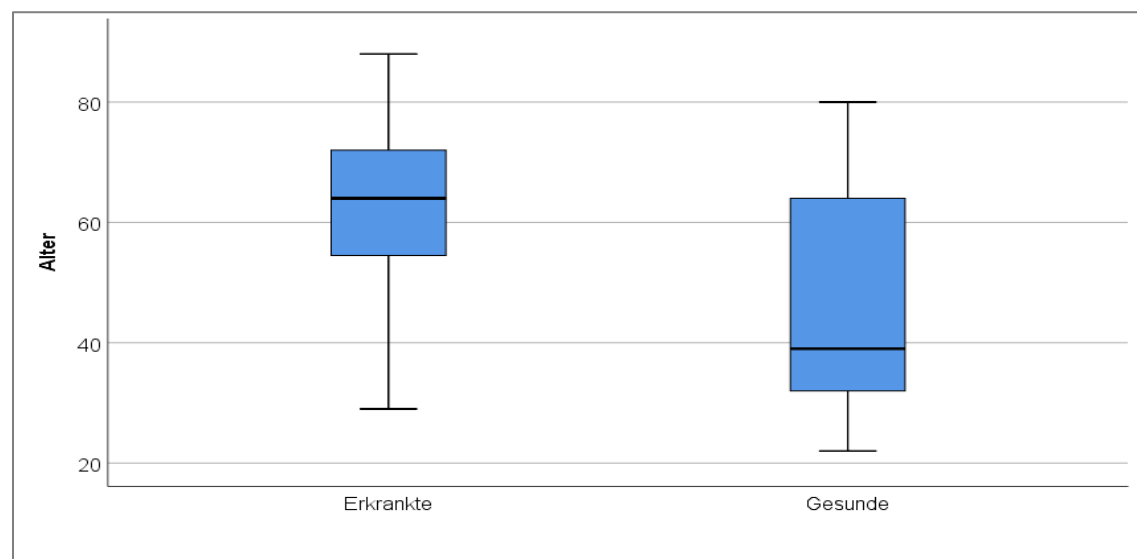
**Abbildung 6: Altersverteilung der erkrankten Personen**

Der Altersgipfel lag in der Gruppe der Erkrankten zwischen 60 und 70 Jahren. Um das vierte Jahrzehnt gab es kaum Erkrankte. Insgesamt war zu beobachten, dass es in einem Alter unter 30 oder über 80 Jahren wenige Erkrankungen gab.



**Abbildung 7: Altersverteilung der gesunden Personen**

Die meisten gesunden Personen hatten zum Zeitpunkt der Blutabnahme ein Alter zwischen 30 und 35 Jahren, nur wenige waren in einem Alter unter 30 oder über 80 Jahre.



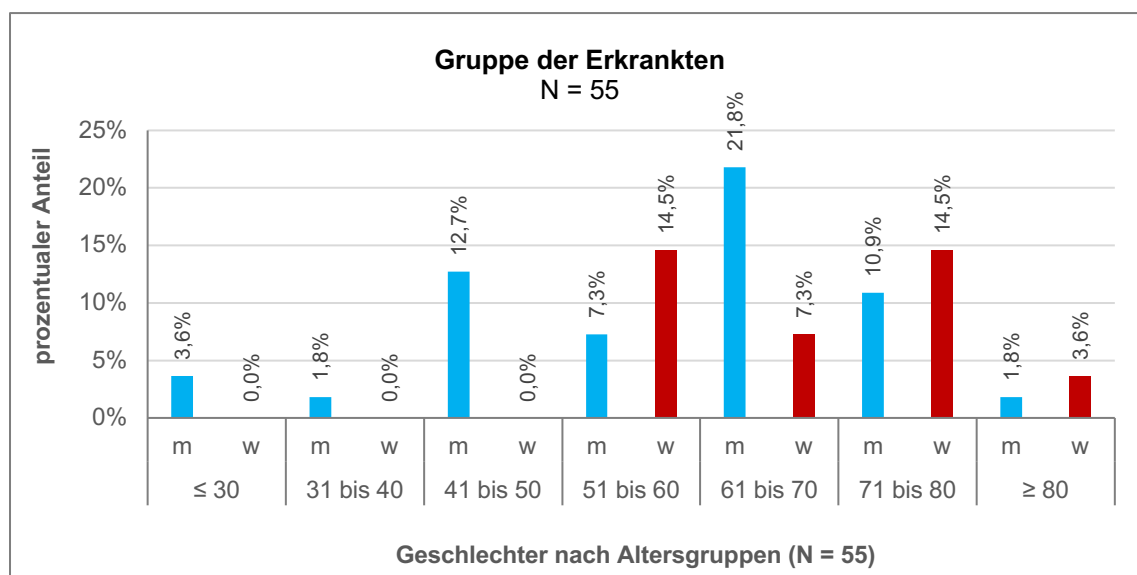
**Abbildung 8: Darstellung der Altersverteilung bei den Erkrankten versus den Gesunden als Boxplot-Diagramm**

Der Median ist durch die Horizontale innerhalb der Box beschrieben, die obere Horizontale entspricht der 75%-Perzentile, die untere Horizontale entspricht der 25%-Perzentile. Der Messbereich ist als vertikale Linie



dargestellt. Die Abbildung zeigt auf, dass das mittlere Alter mit Anfang 60 bei den Kranken deutlich über dem der Gesunden (40 Jahre) lag.

In einem direkten Vergleich der prozentualen Häufigkeit erkrankter Frauen und Männer pro Lebensdekade zeigt sich, dass in der vorliegenden Studie keine Frau an einem oralen Plattenepithelkarzinom in einem Alter unter der fünften Lebensdekade erkrankt ist, bei den Männern gab es auch Erkrankungsfälle in einem Alter zwischen der zweiten und der vierten Lebensdekade (siehe Abbildung 9).



**Abbildung 9: Graphische Darstellung der geschlechtsbezogenen Altersverteilung der Erkrankten**

Es zeigen sich bei den erkrankten Personen zwei Erkrankungsgipfel in der Altersgruppe zwischen 51 und 60 Jahren und in der Altersgruppe zwischen 71 und 80 Jahren, bei den männlichen Betroffenen hingegen lag der Altersgipfel zwischen 61 und 70 Jahren.

Tabelle 19 verdeutlicht, dass das mittlere Alter der Frauen in der Gruppe der Erkrankten deutlich über dem der Männer lag. Das heißt, dass die Männer in einem durchschnittlich jüngeren Alter erkrankt sind als die Frauen. In der Kontrollgruppe verhält es sich gegenläufig (siehe Tabelle 20): Das mittlere Alter der Männer lag hier deutlich unter dem der Frauen.

**Tabelle 19: Geschlechtsbezogene Altersverteilung der Erkrankten**

<b>Erkrankte</b>	<b>N</b>	<b>Mittelwert</b>	<b>SD</b>	<b>Median</b>	<b>Minimum</b>	<b>Maximum</b>
Männer	33	59,82	14,286	63,00	29	86
Frauen	22	67,91	10,341	69,50	52	88

**Tabelle 20: Geschlechtsbezogene Altersverteilung der Gesunden**

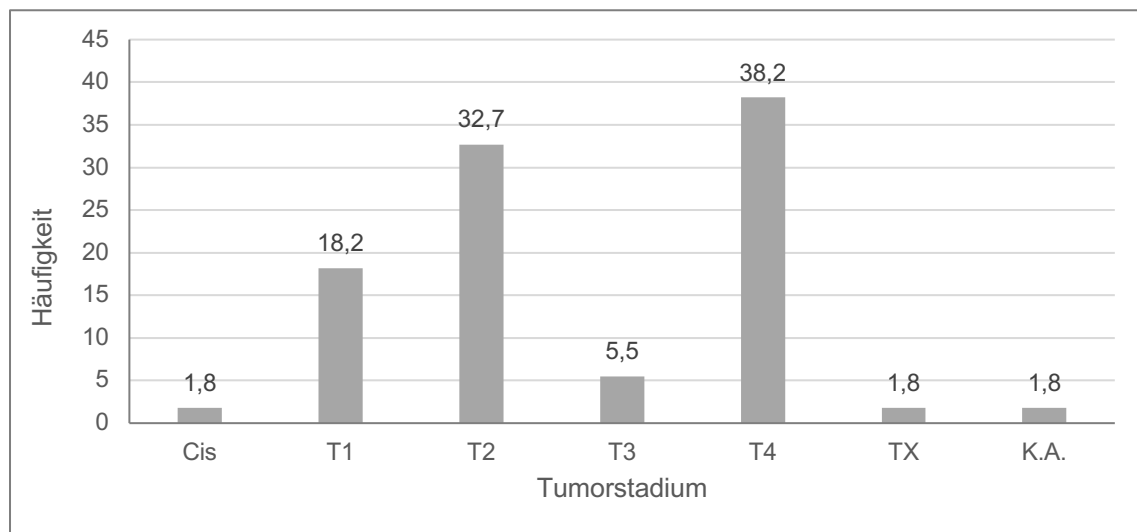
<b>Gesunde</b>	<b>N</b>	<b>Mittelwert</b>	<b>SD</b>	<b>Median</b>	<b>Minimum</b>	<b>Maximum</b>
Männer	12	51,58	17,625	49,50	31	77
Frauen	21	44,19	18,854	34,00	22	80

### 3.2 Häufigkeiten der kategorialen Variablen

Bei allen erkrankten Personen, die in die Studie inkludiert wurden und bei denen ein Tag vor der Operation eine Blutabnahme vorgenommen wurde, wurde der Tumor nach Möglichkeit vollständig entfernt und histopathologisch klassifiziert. Nicht bei jedem Erkrankten konnten alle Klassifikationen (T, N, M, L, V, Pn, R, G) bestimmt werden.

Die Kategorien (T, N, G, R) des Klassifizierungssystems wurden separat betrachtet.

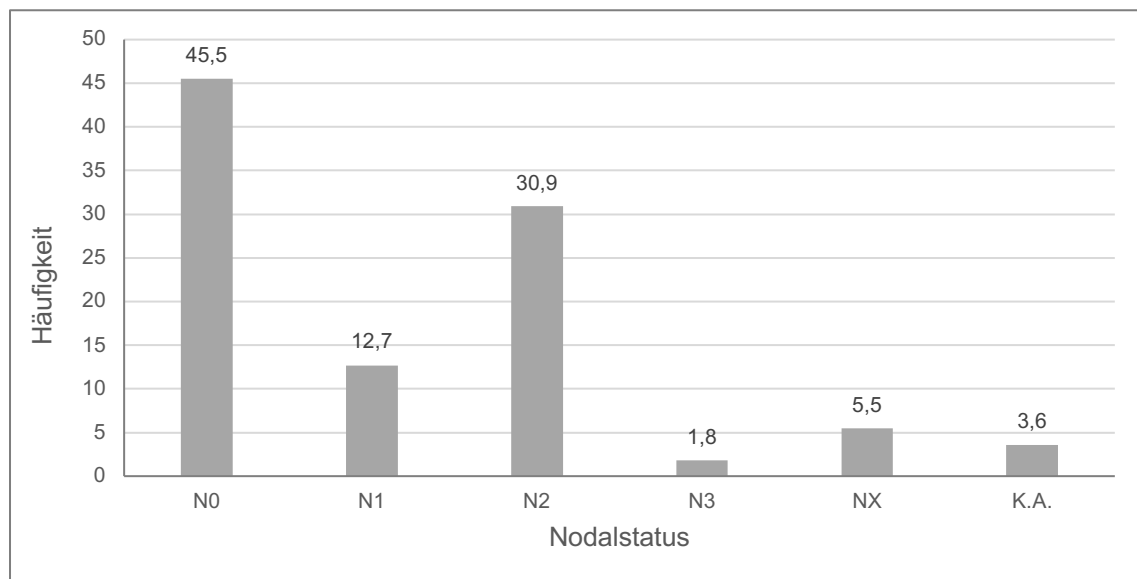
### 3.2.1 Tumor



**Abbildung 10: Häufigkeitsverteilung des T-Stagings bei Personen mit einem oralen Plattenepithelkarzinom**

Nach der histopathologischen Untersuchung des eingesendeten Tumorpräparats verzeichneten 38,2 % Prozent der erkrankten Personen das Tumorstadium T4. Am zweithäufigsten kam das Tumorstadium T2 mit einem prozentualen Anteil von 32,7 an den Erkrankten vor. Das Tumorstadium T1 kam bei 18,2 % aller Betroffenen vor. Am seltensten trat das Tumorstadium T3 mit 5,5 % auf. Bei einer erkrankten Person wurde in der histopathologischen Untersuchung festgestellt, dass es sich bei dem Resektionspräparat nur um eine Vorstufe eines Karzinoms - ein sogenanntes Carcinoma in situ – handelte. Bei einem Erkrankten konnte das Tumorstadium nicht beurteilt werden, bei einer weiteren betroffenen Person wurden keine Angaben zur Tumorklassifikation gemacht. Dies entsprach jeweils einer Häufigkeit von 1,8 %.

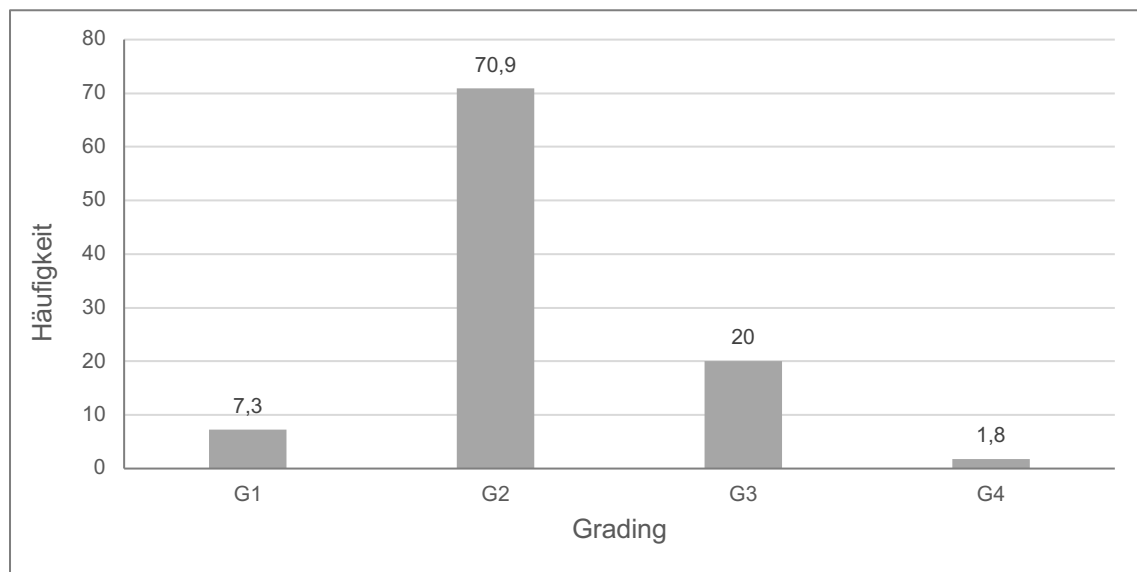
### 3.2.2 Nodal-Status



**Abbildung 11: Häufigkeitsverteilung des N-Stagings bei Personen mit einem oralen Plattenepithelkarzinom**

Bei 45,5 % der untersuchten erkrankten Personen konnte keine Lymphknotenbeteiligung in der histopathologischen Untersuchung nachgewiesen werden. Das Stadium N2, unterteilt in N2a, N2b und N2c, fand sich mit 30,9 % am zweithäufigsten, das Stadium N1 trat hingegen nur bei 12,7 % aller erkrankten Personen auf. Am seltensten kam das Stadium N3 mit 1,8 % vor. Bei 5,5 % aller Erkrankten war der regionale Lymphknotenstatus histopathologisch nicht beurteilbar. Bei zwei erkrankten Personen (3,6 %) waren keine Angaben zum Lymphknotenstatus dokumentiert.

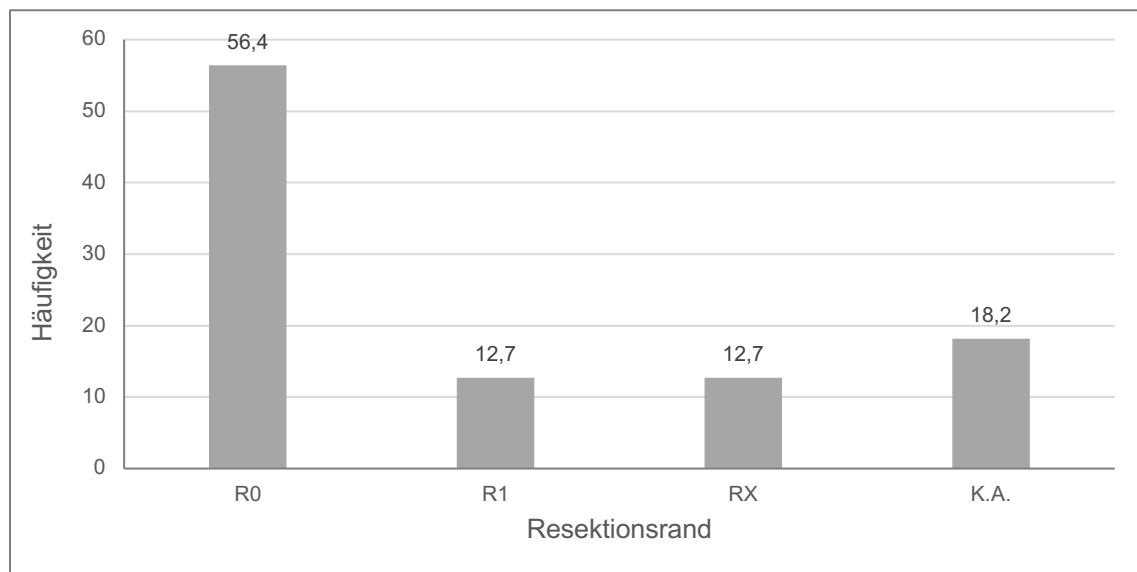
### 3.2.3 Grading



**Abbildung 12: Häufigkeitsverteilung des Gradings bei Personen mit einem oralen Plattenepithelkarzinom**

Betrachtet man das Patientenkollektiv bezüglich des Differenzierungsgrades des Tumors, lag das Stadium G2 mit 70,9 % am häufigsten vor und G3 war mit 20,0 % am zweithäufigsten vertreten. Gut differenziert im Stadium G1 war der Tumor nur bei 7,3 % aller Erkrankten und schlecht differenziert im Stadium G4 bei 1,8 %.

### 3.2.4 Resektionsrand



**Abbildung 13: Häufigkeitsverteilung der Beurteilung des Resektionsrands bei Personen mit einem oralen Plattenepithelkarzinom**

Betrachtet man das Kollektiv der Erkrankten bezüglich des Zustands des postoperativen Resektionsrands, konnte bei 56,4 % aller erkrankten Personen histopathologisch kein Tumorgewebe am Resektionsrand nachgewiesen werden. Bei je 12,7 % wurde entweder Tumorgewebe nachgewiesen oder der Resektionsrand konnte nicht beurteilt werden. Dies entsprach einer Häufigkeit von 25,4 %. Bei 18,2 % der betroffenen Personen wurden keine Angaben zum Zustand des Tumorrands gemacht.

Weitere kategoriale Variablen:

Lymphgefäßinfiltration, perineuronale Invasion, extrakapsuläres Wachstum

Bei der Klassifizierung des Tumors wurden zu den kategorialen Variablen Lymphgefäßinfiltration (L), perineurale Invasion (Pn) und extrakapsuläre Tumorausdehnung (ECE) bei einem Teil der erkrankten Personen Angaben gemacht (siehe Tabellen 21, 22 und 23). Beim prozentual größten Anteil der Erkrankten in dieser Studie wurde bezüglich der Variablen L, Pn und ECE keine Klassifizierung dokumentiert. Die Klassifizierung der verbliebenen Fälle wird der Vollständigkeit halber dennoch angeführt. In 5,5 % aller Fälle konnte keine Ausbreitung der Krebszellen ins Lymphbahnsystem nachgewiesen werden, bei 20 % der Studienteilnehmenden hatte bereits eine Ausbreitung von Krebszellen in die Lymphbahnen

stattgefunden. Ein Befall der Nervenbahnen wurde bei 14,5 % nachgewiesen. Bei 21,8 % der 55 erkrankten Personen wurde dokumentiert, dass keine extrakapsuläre Ausdehnung von Lymphknotenmetastasen stattgefunden hatte. Bei 14,5 % hingegen wurde ein extrakapsuläres Wachstum der Lymphknotenmetastasen bestätigt. Zur Invasion ins venöse Blutgefäßsystem wurden keine Angaben gemacht. Bei keinem der 55 Erkrankten wurde eine Fernmetastasierung dokumentiert.

**Tabelle 21: Lymphgefäßinfiltration**

<b>Lymphbahninfiltration</b>	<b>Anzahl</b>	<b>%</b>
LO	3	5,5
L1	11	20
k. A.	41	74,5

**Tabelle 22: Perineuronale Invasion**

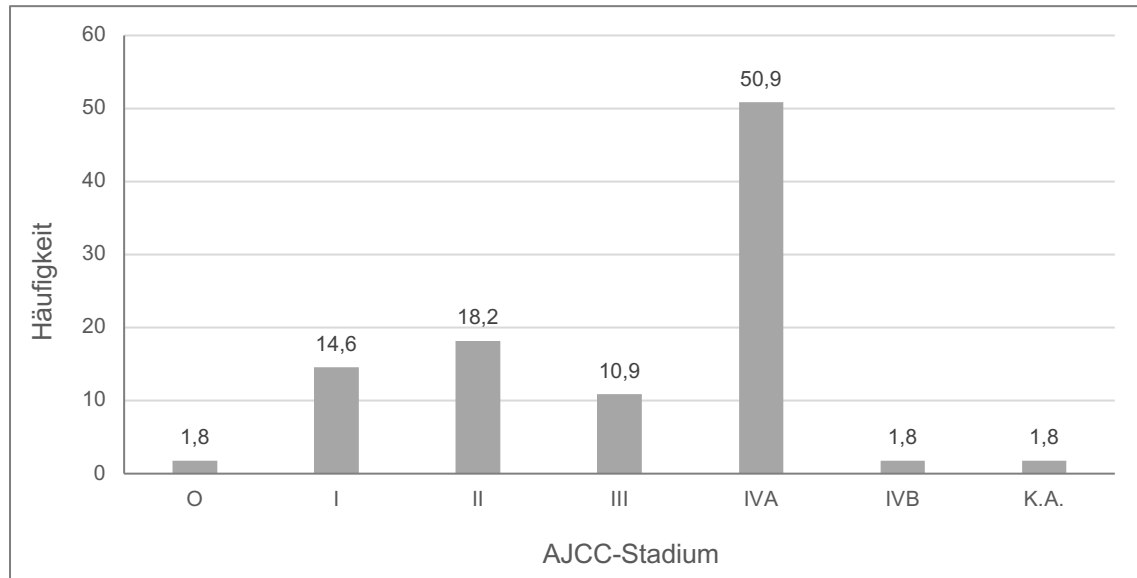
<b>perineuronale Invasion</b>	<b>Anzahl</b>	<b>%</b>
Pn1	8	14,5
k. A.	47	85,5

**Tabelle 23: Extrakapsuläre Ausdehnung von Lymphknotenmetastasen**

<b>ECE</b>	<b>Anzahl</b>	<b>%</b>
ECE-	12	21,8
ECE+	8	14,5
k. A.	35	63,7

## AJCC-Stadium

Im AJCC-Code werden die unterschiedlichen Variablen des Klassifizierungssystems gemeinsam beurteilt, wie in Abbildung 14 veranschaulicht wird. Bis auf eine Ausnahme konnte jede der erkrankten Personen nach dem AJCC-Code einer entsprechenden Gruppe zugeordnet werden.



**Abbildung 14: Häufigkeitsverteilung des AJCC-Stadiums bei Personen mit einem oralen Plattenepithelkarzinom**

Der größte Teil der erkrankten Personen wurde mit 50,9 % der Gruppe IVA nach AJCC zugeordnet, am zweithäufigsten fanden sich Erkrankte in der Gruppe II mit 18,2 %. Die wenigsten wurden der Gruppe I mit 14,6 % beziehungsweise der Gruppe III mit 10,9 % zugeordnet. Je eine erkrankte Person (1,8 %) wurde der Gruppe 0 und der Gruppe IVB zugeordnet. Eine weitere betroffene Person (1,8 %) konnte aufgrund unvollständiger Angaben keiner Gruppe zugeteilt werden.

## 3.3 Expressionsanalyse der $\beta 6$ -mRNA

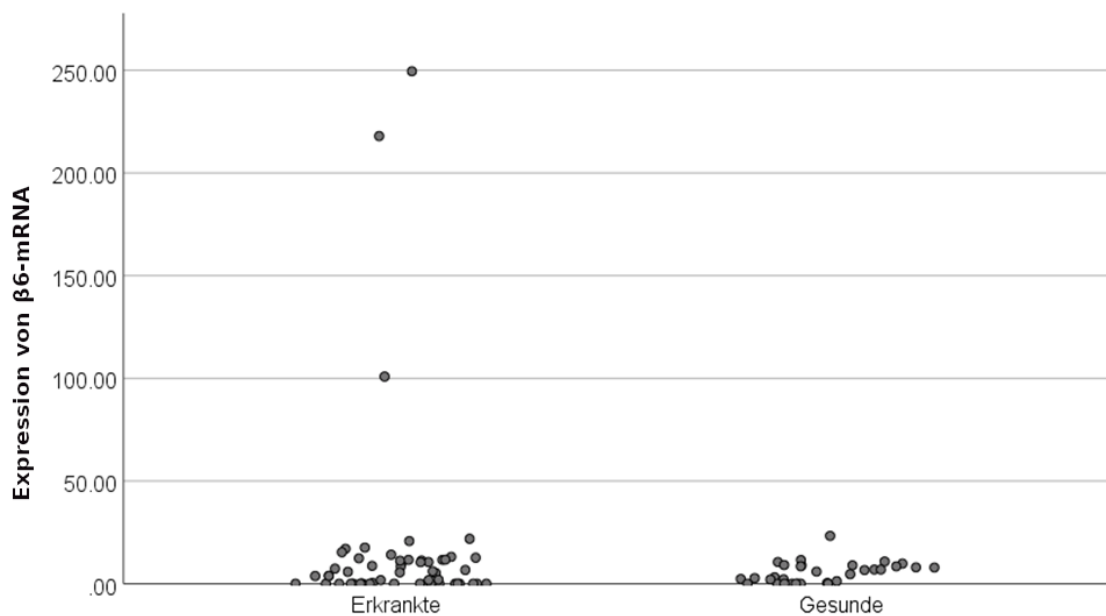
### 3.3.1 Definition der Expression der $\beta 6$ -mRNA

Wie unter Punkt 1.6 beschrieben, wird dem Integrin  $\alpha\beta 6$  eine entscheidende Rolle bei der Tumorentstehung und Metastasierung zugeschrieben. Es stellte sich die Frage, inwieweit die mRNA der  $\beta 6$ -Untereinheit des Integrin  $\alpha\beta 6$  als Tumormarker eingesetzt werden



kann. Da die  $\beta 6$ -Untereinheit ausschließlich mit  $\alpha v$  als Dimer vorkommt, fungiert ihr Nachweis als Surrogatmarker für das Integrin-Dimer  $\alpha v\beta 6$ . Um die  $\beta 6$ -mRNA im Blut beziehungsweise aus im Blut zirkulierenden Zellen zu quantifizieren, wurde ein Verhältniswert herangezogen. Die GAPDH gilt als Housekeeping-Protein und wird in jeder Zelle exprimiert. Nach Normierung durch Division der errechneten Kopienzahl des Target-Gens ( $\beta 6$ -mRNA) durch die Kopienzahl des Housekeeping-Gens (GAPDH) erfolgte eine Quantifizierung der unterschiedlichen Expression des untersuchten Gens in den verschiedenen Studiengruppen. Dieser Verhältniswert spiegelt die höhere Expression der  $\beta 6$ -mRNA gegenüber dem GAPDH wider.

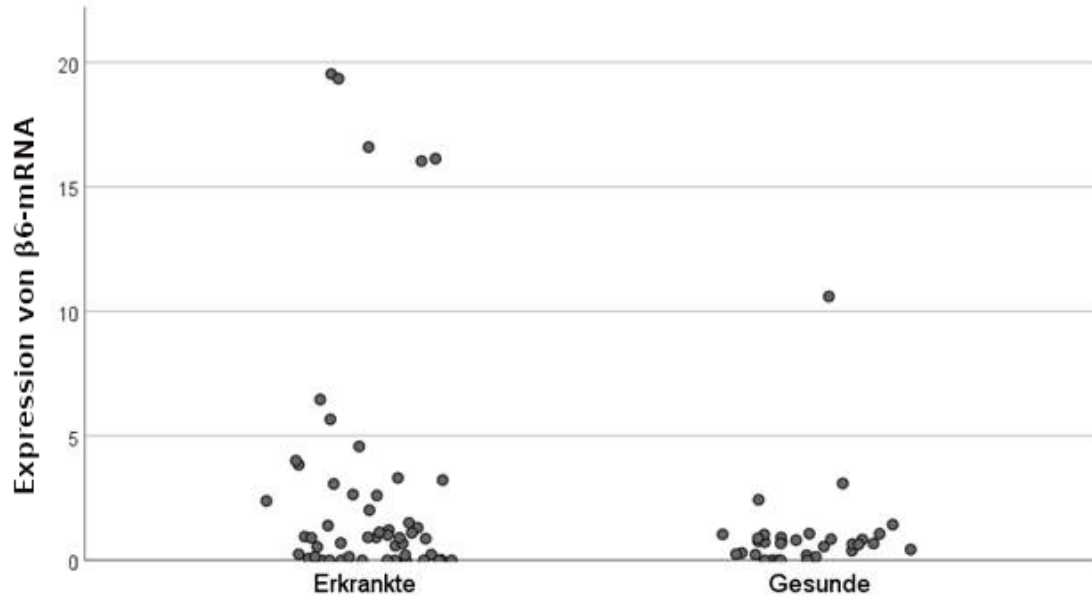
### 3.3.2 Darstellung der Einzelmesswerte der Expression von $\beta 6$ -mRNA



**Abbildung 15: Graphische Darstellung der Einzelmesswerte im Bereich von 0 bis 250**

Gegenüberstellung der einzelnen Messwerte der Expression von  $\beta 6$ -mRNA der erkrankten und der gesunden Personen. Aus dieser Darstellung geht hervor, dass in beiden Gruppen das Expressionslevel von  $\beta 6$ -mRNA bei zahlreichen Messungen nur knapp über 0 lag; der größte Teil der Messungen bewegte sich bei einem Expressionslevel zwischen 0 und 1. In der

Gruppe der Erkrankten lag das Expressionslevel von  $\beta 6$ -mRNA bei einigen Messungen hoch.



**Abbildung 16: Graphische Darstellung der Einzelmesswerte im Bereich von 0 bis 20**

Gegenüberstellung der einzelnen Messwerte der Expression von  $\beta 6$ -mRNA der erkrankten und der gesunden Personen in einem vergrößerten Ausschnitt. Dieser ermöglicht eine detailliertere Beurteilung der Einzelmesswerte. Auch aus dieser Darstellung geht hervor, dass in beiden Gruppen das Expressionslevel von  $\beta 6$ -mRNA bei zahlreichen Messungen knapp über 0 lag; bei den Erkrankten bewegte sich das Expressionslevel bei 35 (63,6 %) der Personen zwischen 0 und 0,99, hingegen zeigten bei den Gesunden nur 28 (84,8 %) der Teilnehmenden einen Wert zwischen 0 und 0,99. Es zeigten 20 (36,4 %) der Erkrankten ein Expressionslevel von  $\beta 6$ -mRNA größer oder gleich 1, bei den Gesunden waren es nur 5 (15,2 %).

Tabelle 24 stellt die Expression von  $\beta 6$ -mRNA von Erkrankten und Gesunden gegenüber. Bei den Erkrankten bewegte sich das Expressionslevel bei 35 (63,6 %) der Teilnehmenden in einem niedrigen Bereich unter 1, bei den Gesunden war dies bei 28 (84,8 %) der Versuchspersonen der Fall. In einem mittleren Expressionsbereich lagen 9 (16,4 %) der Erkrankten und 4 (12,1 %) der Gesunden. Es waren 9 (16,4 %) der Erkrankten und nur einer (3,1 %) der Gesunden in einem hohen Messbereich zwischen 5 und 99,9. Zwei

Erkrankte hatten sehr hohe Expressionswerte in einem Bereich über 100, keiner der Gesunden hatte einen sehr hohen Wert.

**Tabelle 24: Tabellarische Gegenüberstellung der Einzelmesswerte**

Expression β6-mRNA	Niedrig 0 bis 0,99	Mittelhoch 1 bis 4,99	Hoch 5 bis 99,9	Sehr hoch Größer 100
Krank	35 (63,6 %)	9 (16,4 %)	9 (16,4 %)	2 (13,6 %)
Gesund	28 (84,8 %)	4 (12,1 %)	1 (3,1 %)	0

Sowohl aus Abbildung 15 und 16 als auch aus Tabelle 24 geht hervor, dass das Expressionslevel bei den Erkrankten deutlich häufiger (36,4 %) in einem mittleren bis sehr hohen Bereich liegt als bei den Gesunden (15,2 %). Ein Wert größer oder gleich 1 könnte folglich als Prognoseparameter herangezogen werden und auf das Vorhandensein eines oralen Plattenepithelkarzinoms oder eines Tumorrezidivs hinweisen.

### 3.3.3 Deskriptive Werte zur Expression der β6-mRNA

In diesem Abschnitt werden die deskriptiven Werte zum Expressionslevel der β6-mRNA dargestellt, wobei beide Gruppen betrachtet werden. Dazu werden Häufigkeits- und Verteilungstabellen sowie entsprechende Graphiken präsentiert.

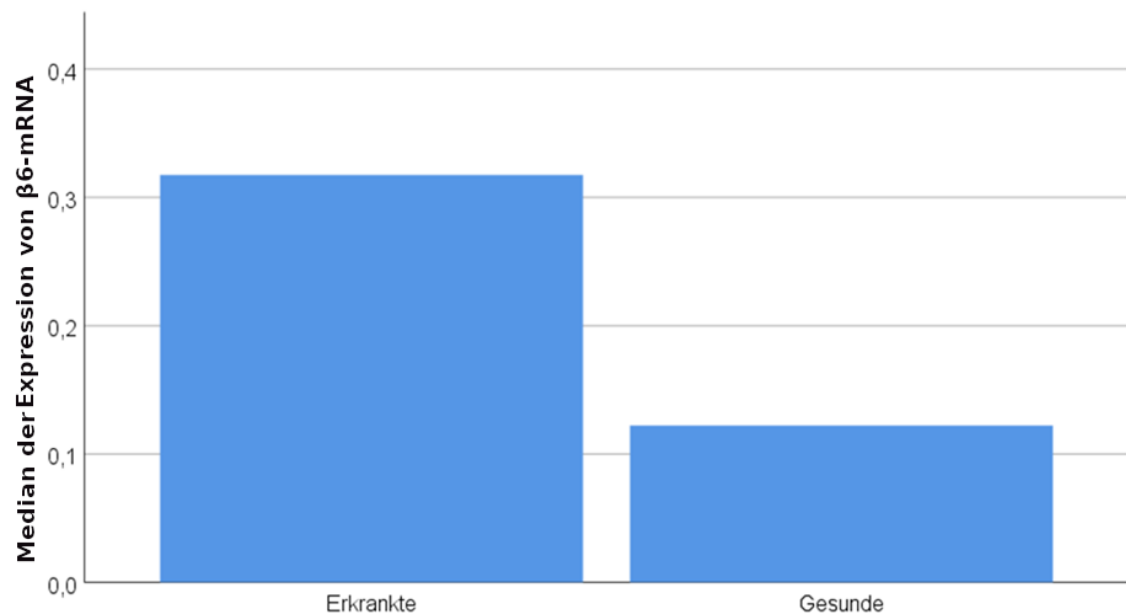
In Tabelle 25 sind die deskriptiven Werte zum Expressionslevel von β6-mRNA, nach Gruppen getrennt, zusammengefasst.

**Tabelle 25: Deskriptive Werte zum Expressionslevel von β6-mRNA, getrennt nach Gruppen**

Gruppe	N	Mittelwert	SD	Median	Minimum	Maximum
Erkrankte	55	12,5195	44,53535	0,3174	0,0	236,91
Gesunde	33	0,6664	1,81225	0,1221	0,0	10,24
Gesamt	88	8,0746	35,57512	0,1940	0,0	236,91



### 3.3.5 Graphische Darstellung des Medians der Expression von $\beta 6$ -mRNA



**Abbildung 18: Graphische Darstellung des Medians von Erkrankten versus Gesunden**

Der Mittelwert kann durch Extremwerte verzerrt werden. In der vorliegenden Arbeit war die Beurteilung des Medians daher wesentlich, da dieser durch extreme Abweichungen weniger stark beeinflusst wird als der Mittelwert. Diesbezüglich geht aus der Abbildung hervor, dass der Median bei den Erkrankten mit 0,3174 höher war als bei den Gesunden mit 0,1221, wenngleich die Unterschiede beim Mittelwert (12,5195 versus 0,6664) deutlicher ausgeprägt waren. Diese große Differenz zwischen beiden Gruppen ist auf die extremen Ausreißer im Messbereich zurückzuführen.

## 3.4 Induktive Auswertungen

Die einzelnen Fragestellungen werden im Folgendem statistisch untersucht. Dazu werden entsprechende SPSS-Outputs vorgestellt und interpretiert.

Der Wert 0,05 als Signifikanzniveau wurde für alle aufgeführten statistischen Tests verwendet. Es galt dabei als nicht erreicht, wenn ein p-Wert größer als 0,05 ermittelt wurde. Ein hochsignifikantes Ergebnis lag vor, wenn der p-Wert unter 0,01 lag, von signifikanten Resultaten wurde bei p-Werten zwischen 0,01 und 0,05 ausgegangen. Werte, die zwischen 0,05 und 0,1 lagen, wurden als schwach signifikante Ergebnisse bezeichnet. (Eckey, 2006)

### 3.4.1 Unterschiede beim Expressionslevel von $\beta 6$ -mRNA zwischen den Gruppen

Wie unter 3.3 beschrieben wurde, lagen bei der Expression von  $\beta 6$ -mRNA in beiden Gruppen mehrere extreme Ausreißer vor. Um zu überprüfen, ob signifikante Unterschiede im Expressionslevel von  $\beta 6$ -mRNA zwischen Erkrankten und Gesunden vorlagen, wurde der Mann-Whitney-U-Test eingesetzt. Dabei wurde der gesamte Datensatz beider Gruppen gepoolt und in eine Rangfolge gebracht. Mit diesen Rangdaten wurde weiterverfahren, indem die Ränge 1–n gebildet wurden. Anschließend wurden die Daten separat je Gruppe betrachtet. Es wurden jeweils Rangsummen erstellt und per Signifikanztest wurde untersucht, ob ein Unterschied im Expressionslevel von  $\beta 6$ -mRNA zwischen den Gruppen vorlag. Die Rangsummen entschieden demnach über die Höhe des p-Werts. Daraus resultierte folgender Output:

**Tabelle 26: Rangbildung in der Gruppe der Erkrankten und Gesunden**

Gruppe	N	mittlerer Rang	Rangsumme
Erkrankte	55	49,75	2736,00
Gesunde	33	35,76	1180,00
Gesamt	88		

**Tabelle 27: Statistik für Test<sup>a</sup> Gruppe**

Mann-Whitney-U	619,000
Wilcoxon-W	1180,000
Z	-2,487
Asymptomatische Signifikanz (zweiseitig)	0,013

<sup>a</sup> Gruppenvariable: Gruppe

Aus Tabelle 26 geht hervor, dass die Gruppe der Erkrankten einen höheren mittleren Rang erhielt als die der Gesunden, was bereits auf einen signifikanten Unterschied hindeutete. Hinsichtlich des statistischen Nachweises der Unterschiede zwischen den Erkrankten und den Gesunden kann Tabelle 27 betrachtet werden. Besonderes Augenmerk lag hier bei der

Auswertung auf der asymptotischen Signifikanz – mit dieser wurde der p-Wert wiedergegeben. War er niedriger als 0,05, wurde von einem statistisch signifikanten Unterschied ausgegangen. In diesem Fall war er mit 0,013 deutlich niedriger als 0,05, woraus geschlossen wurde, dass die Erkrankten signifikant höhere Werte in der Expression von  $\beta 6$ -mRNA aufwiesen als die Gesunden.

### 3.4.2 Altersunterschied zwischen den Gruppen

Da beim Alter keine extremen Abweichungen vorhanden waren, konnte zur Untersuchung entsprechender Unterschiede der t-Test verwendet werden. Er wird prinzipiell eingesetzt, um Mittelwertunterschiede zwischen zwei normalverteilten Stichproben zu untersuchen. Die Normalverteilung und die Varianzhomogenität der Daten sind Voraussetzungen zur Durchführung eines t-Tests. Geprüft werden diese mit dem Levene-Test, mit dem untersucht wird, ob die Mittelwerte beider Stichproben identisch sind (siehe Tabelle 28). Ist ein großer Unterschied in den Stichprobenumfängen gegeben, wird der Welch-Test eingesetzt, der robuster gegenüber stark unterschiedlichen Stichprobengrößen ist, wobei damit aber trotzdem dieselbe Fragestellung untersucht wird. (Hedderich & Sachs, 2018)

**Tabelle 28: Gruppenstatistiken zum Alter**

Gruppe	N	Mittelwert	SD	Standardfehler des Mittelwerts
Erkrankte	55	63,05	13,362	1,802
Gesunde	33	46,88	18,493	3,219

**Tabelle 29: Test bei unabhängigen Stichproben**

Levene-Test der Varianzgleichheit		t-Test für die Mittelwertgleichheit						
F	Sig.	t	df	Sig. (2-seitig)	mittlere Differenz	Standardfehler der Differenz	95%-Konfidenzintervall der Differenz	
							untere	obere

Alter:	12,093	0,001	4,748	86	0,000	16,176	3,407	9,404	22,948
Varianzen gleich									
Varianzen ungleich			4,385	52,154	0,000	16,176	3,689	8,774	23,578

Der Levene-Test wird auch als *Varianzhomogenität* bezeichnet, da mit diesem überprüft wird, ob die Streuung in beiden Gruppen gleich ist, was als Voraussetzung für die Anwendung des t-Tests gilt. Ist der p-Wert beim Levene-Test signifikant, sind die Varianzen nicht gleich und die untere Zeile wird zur weiteren Interpretation verwendet. Um die Varianzhomogenität auszugleichen, wird eine sogenannte Welch-Korrektur durchgeführt. Sind die Varianzen gleich, wird die obere Zeile interpretiert. Hierbei handelt es sich dann um den tatsächlichen t-Test. Wie aus Tabelle 29 hervorgeht, war der Levene-Test im vorliegenden Fall signifikant, was bedeutet, dass die Varianzen nicht gleich waren und die untere Zeile interpretiert wurde. Zudem wird ersichtlich, dass der p-Wert des t-Tests hochsignifikant war ( $p < 0,001$ ). Es bestand demnach ein deutlicher Unterschied zwischen den beiden Gruppen bezüglich des Alters – die Gesunden waren signifikant jünger.



### 3.4.3 Ergebnisse der Korrelationen

#### 3.4.3.1 Deskriptive Darstellung der Faktorstufen

In den Tabellen 30 bis 34 sind die Faktorstufen AJCC-Code, Tumor, Nodal-Status, Grading und Resektionsrand deskriptiv angeführt.

**Tabelle 30: Deskriptive Werte zur Expression von  $\beta 6$ -mRNA bezogen auf AJCC-Code**

AJCC-Code	N	Mittelwert	SD	Median	Minimum	Maximum
0	1	19,7663	0,00	19,7663	19,77	19,77
I	8	0,3432	0,60142	0,0789	0,00	1,77
II	10	2,7868	5,19448	0,8229	0,00	16,86
III	6	0,6760	1,25663	0,1756	0,01	3,22
IVA	28	22,4098	61,13548	0,3533	0,01	236,91
IVB	1	4,1003	0,00	4,1003	4,10	4,10
Gesamt	54	12,7039	44,93233	0,3085	0,00	236,91

**Tabelle 31: Deskriptive Werte zur Expression von  $\beta 6$ -mRNA bezogen auf Tumorstadium**

Tumor	N	Mittelwert	SD	Median	Minimum	Maximum
Cis	1	19,7663	0,00	19,7663	19,77	19,77
T1	10	0,6149	1,05963	0,1379	0,00	3,22
T2	18	14,9400	52,18542	0,4118	0,00	223,00
T3	3	6,6419	11,38728	0,0844	0,05	19,79
T4a	21	17,6658	53,87640	0,3174	0,01	236,91
TX	1	0,2667	0,00	0,2667	0,27	0,27
Gesamt	54	12,7039	44,93233	0,3085	0,00	236,91

**Tabelle 32: Deskriptive Werte zur Expression von  $\beta 6$ -mRNA bezogen auf Nodal-Status**

<b>Nodus</b>	<b>N</b>	<b>Mittelwert</b>	<b>SD</b>	<b>Median</b>	<b>Minimum</b>	<b>Maximum</b>
N0	25	2,4414	5,05421	0,1843	0,00	19,77
N1	7	34,4622	89,27930	0,3174	0,01	236,91
N2b	12	10,9901	25,78807	0,3444	0,07	89,97
N2c	5	46,0856	98,94412	0,2318	0,05	223,00
N2a	1	4,1003	0,00	4,1003	4,10	4,10
NX	3	0,4555	0,69472	0,0942	0,02	1,26
Gesamt	53	12,6424	45,36002	0,2995	0,00	236,91

**Tabelle 33: Deskriptive Werte zur Expression von  $\beta 6$ -mRNA bezogen auf Grading**

<b>Grading</b>	<b>N</b>	<b>Mittelwert</b>	<b>SD</b>	<b>Median</b>	<b>Minimum</b>	<b>Maximum</b>
1	4	9,3345	10,43828	8,6938	0,18	19,77
2	39	7,9515	35,65944	0,2318	0,00	223,00
3	11	31,0067	73,27109	2,2897	0,09	236,91
4	1	0,0504	0,00	0,050 4	0,05	0,05
Gesamt	55	12,5195	44,53535	0,3174	0,00	236,91

**Tabelle 34: Deskriptive Werte zur Expression von  $\beta 6$ -mRNA bezogen auf Resektionsrand**

<b>Resektionsrand</b>	<b>N</b>	<b>Mittelwert</b>	<b>SD</b>	<b>Median</b>	<b>Minimum</b>	<b>Maximum</b>
R0	31	2,9595	5,78366	0,2318	0,00	19,79
R1	7	35,2418	88,94400	2,2897	0,01	236,91
RX	7	45,9880	84,72550	1,2434	0,01	223,00
Gesamt	45	14,6745	48,99432	0,3174	0,00	236,91

### 3.4.4 Korrelation zwischen Expression von $\beta 6$ -mRNA und Faktorstufen (AJCC-Code, T, N, G)

Eine Korrelation dient als Zusammenhangsmaß für metrische und ordinal skalierte Merkmale. Der Koeffizient nach Spearman wird eingesetzt, wenn ordinal skalierte sowie nicht normalverteilte metrische Merkmale vorliegen. Bei diesem Verfahren wird nicht der ursprüngliche Datensatz verwendet, sondern mit den vorhandenen Daten werden Ränge gebildet. Im Datensatz lagen mehrere ordinale Daten vor, weshalb diese in eine Rangfolge gebracht werden konnten. Diesbezüglich wurde geprüft, ob ein Zusammenhang mit dem Expressionslevel von  $\beta 6$ -mRNA vorlag. Da sich die Daten teils ordinal, teils mit starken Abweichungen zeigten, wurde zur Untersuchung die Spearman-Korrelation verwendet.

**Tabelle 35: Korrelationen zwischen Expression von  $\beta 6$ -mRNA und Kategorien (AJCC-Code, G, T, N) nach Spearman-Rho**

Spearman-Rho	AJCC-Code	Korrelationskoeffizient	0,227
		Sig. (2-seitig)	0,100
		N	54
Spearman-Rho	Grading	Korrelationskoeffizient	0,066
		Sig. (2-seitig)	0,631
		N	55
Spearman-Rho	Tumor	Korrelationskoeffizient	0,095
		Sig. (2-seitig)	0,497
		N	53
Spearman-Rho	Nodus	Korrelationskoeffizient	0,258
		Sig. (2-seitig)	0,070
		N	50

Ob ein Zusammenhang statistisch signifikant ist, lässt sich anhand von *Sig.* beurteilen. Hierbei handelt sich um den p-Wert zum Korrelationstest. Beläuft sich dieser Wert auf unter 0,05, wird von einem statistisch signifikanten Zusammenhang gesprochen. Die Beurteilung des Vorzeichens des Korrelationskoeffizienten ( $r$ ) lässt auf die Art des Zusammenhangs schließen. Positive Korrelationskoeffizienten sprechen für einen gleichgerichteten Zusammenhang, bei negativen Vorzeichen besteht ein gegengerichteter

Zusammenhang. Die Werte befinden sich immer zwischen  $-1$  und  $+1$ . Die Korrelation ist schwach ausgeprägt, wenn der absolute Wert niedriger als  $0,5$  ist, und stark, wenn er über  $0,8$  liegt. Werte dazwischen sprechen für einen mittelstarken Zusammenhang. Die Interpretation von  $r$  ist nur sinnvoll, wenn eine statistische Signifikanz gegeben ist. (Fahrmeir et al., 2016)

Aus Tabelle 35 geht hervor, dass keiner der p-Werte niedriger als  $0,05$  ist. Daraus konnte geschlossen werden, dass keine statistisch signifikanten Zusammenhänge zwischen den Variablen (AJCC, G, T, N) und dem Expressionslevel von  $\beta 6$ -mRNA vorlagen. Das heißt, dass Variablen, die ein fortgeschrittenes Stadium der Tumorerkrankung definieren, nicht automatisch zu höheren Werten in der Expression von  $\beta 6$ -mRNA geführt haben. Beim Nodal-Status war der p-Wert mit  $0,07$  allerdings schwach signifikant; je höher die Stufe der Variable N war, desto höher war demnach tendenziell auch das Expressionslevel von  $\beta 6$ -mRNA.

#### 3.4.4.1 Korrelation zwischen Expression von $\beta 6$ -mRNA und dem Zustand des Resektionsrands

Die oben aufgeführten Korrelationen enthielten ordinale Variablen. Zur Untersuchung der dichotomen Variable Resektionsrand wurde wieder der Mann-Whitney-Test angewendet (siehe Tabellen 36 und 37).

**Tabelle 36: Rangbildung Resektionsrand**

Resektionsrand	N	mittlerer Rang	Rangsumme
R0	31	18,94	587,00
R1	7	22,00	154,00
Gesamt	38		

**Tabelle 37: Statistik für Test<sup>a</sup> Resektionsrand**

Mann-Whitney-U	91,000
----------------	--------

Wilcoxon-W	587,000
Z	-0,659
Asymptomatische Signifikanz (2-seitig)	0,510
Exakte Signifikanz [2*(1-seitige Sig.)]	0,530 <sup>b</sup>

<sup>a</sup> Gruppenvariable: Resektionsrand, <sup>b</sup> nicht für Bindungen korrigiert

Der p-Wert war mit  $p = 0,510$  eindeutig nichtsignifikant, es bestand demnach kein Zusammenhang zwischen dem Zustand des Resektionsrandes und der Höhe des Expressionslevels von  $\beta 6$ -mRNA (siehe Tabelle 37).

#### 3.4.4.2 Korrelation zwischen Expression von $\beta 6$ -mRNA und Alter

Aufgrund der Ausreißer wurde bei der Untersuchung des Zusammenhangs zwischen Alter und Expressionslevel von  $\beta 6$ -mRNA wieder der Spearman-Rho-Test angewendet (siehe Tabelle 38).

**Tabelle 38: Korrelationen zwischen Expression von  $\beta 6$ -mRNA und Alter nach Spearman-Rho**

Spearman-Rho	Alter	Korrelationskoeffizient	0,014
		Sig., (2-seitig)	0,897
		N	88

**Tabelle 39: Korrelationen zwischen Expression von  $\beta 6$ -mRNA und Alter, getrennt nach Gruppen, nach Spearman-Rho**

Spearman-Rho	Erkrankte	Alter	Korrelationskoeffizient	-0,192
			Sig., (2-seitig)	0,159
			N	55
Spearman-Rho	Gesunde	Alter	Korrelationskoeffizient	-0,010
			Sig., (2-seitig)	0,957
			N	33

Es bestand kein Zusammenhang zwischen dem Alter und dem Expressionslevel von  $\beta 6$ -mRNA, da sich keine signifikanten p-Werte zeigten (siehe Tabelle 39).

## 4 Diskussion

Die Inzidenz der bösartigen Neubildungen im Mund- und Rachenraum betrug 2016 nach Schätzungen des Robert-Koch-Instituts 13 900. Die Plattenepithelkarzinome der Mundhöhle hatten dabei einen Anteil von 87 %. Im Jahr 2017 belief sich die Sterberate der Frauen auf 1402, die Mortalität der Männer war mit 3963 Fällen mehr als doppelt so hoch. (Robert-Koch-Institut, 2019) Diese Zahlen verdeutlichen, dass es sich hierbei um eine schwerwiegende und gesundheitspolitisch relevante Erkrankung handelt. Obwohl heute moderne Therapieoptionen zur Behandlung eines oralen Plattenepithelkarzinoms bestehen, hat sich an der nach wie vor schlechten Prognose wenig verändert. Es ist inzwischen bekannt, dass der Diagnosezeitpunkt und das Tumorstadium die Aussicht auf Heilung stark beeinflussen. Methoden und Diagnoseinstrumente, die die frühe Erkennung einer bösartigen Veränderung der Mundschleimhaut ermöglichen, spielen dabei eine große Rolle. Das Ziel dieser Arbeit war es, zu untersuchen, ob es gelingt, aus der Blutprobe einer erkrankten Person ein RNA-Isolat des Tumorintegrin  $\alpha\beta6$  zu gewinnen. In weiteren Schritten wurde dieses einer cDNA-Umschreibung und einer PCR zugeführt, um die Höhe der Expression des Integrin im Blut erkrankter und nichterkrankter Personen zu vergleichen. Ob sich dieser Ansatz als Diagnoseinstrument eignet, soll im Folgenden durch eine kritische Betrachtung der Ergebnisse und die Bewertung der Funktionsweise der beschriebenen Methode beurteilt werden.

### 4.1 Kollektiv der erkrankten Personen

#### 4.1.1 Geschlecht der erkrankten Personen

In der Literatur wurde bestätigt, dass die an einem oralen Plattenepithelkarzinom erkrankten Personen häufiger dem männlichen Geschlecht angehören als dem weiblichen. Dies wurde auch im Ergebnisteil dieser Arbeit aufgezeigt: Unter den erkrankten Personen waren in dieser Studie 60 % Männer und 40 % Frauen, was ein Verhältnis von 3:2 darstellt. Ähnliche Ergebnisse wurden in der Literatur gefunden. In dieser wird berichtet, dass 64 % der erkrankten Personen Männer sind und 36 % Frauen (El-Husseiny et al, 2000), oder es zeigte sich ein Verhältnis von 55 % Männern zu 45 % Frauen. (Razavi et al, 2012) In einer

weiteren Studie wird von einer geschlechtlichen Verteilung von 59 % Männern und 41 % Frauen berichtet. (Keski-Säntti et al, 2008) Löhler und Gerstner kommen mit 57 % erkrankten Männern und 43 % erkrankten Frauen auf ein ähnliches Ergebnis. (Löhler et al, 2014) Daraus lässt sich schließen, dass das Resultat dieser Arbeit bezüglich der geschlechtlichen Verteilung gut durch Erkenntnisse anderer einschlägiger Studien belegt werden kann. Der Anteil betroffener Frauen zeigt eine steigende Tendenz (Reddy et al, 2010), die wahrscheinlich im zunehmenden Zigaretten- und Alkoholkonsum beim weiblichen Geschlecht begründet liegt. Somit hat sich das Verhältnis betroffener Männer zu Frauen von 10:1 auf 3:1 verlagert. (Kademani 2007)

Zudem finden sich Studien, in denen ebenfalls häufiger Männer an einem oralen Plattenepithelkarzinom erkrankt waren als Frauen. Das Verhältnis ist dabei mit 4:1 allerdings stark auf die Seite des männlichen Geschlechts verlagert. (Pericot et al, 2000; Kessler et al, 2007)

Ein davon abweichendes Ergebnis wurde mit einem prozentualen männlichen Anteil von 92 % zu einem prozentualen weiblichen Anteil von 8 % ebenfalls in der einschlägigen Literatur vorgefunden. (Schwager et al, 2000) In der Studie von Keski-Säntti lag hingegen ein ausgewogenes Verhältnis mit 41 erkrankten Männern und 39 erkrankten Frauen vor. (Keski-Säntti et al, 2006)

#### 4.1.2 Alter der erkrankten Personen

In dieser Arbeit waren die männlichen erkrankten Personen durchschnittlich 59,81 Jahre alt und die weiblichen erkrankten Personen 67,9 Jahre. Daraus wurde ersichtlich, dass die Männer in einem durchschnittlich jüngeren Alter an einem Plattenepithelkarzinom erkrankt sind als die Frauen. Dieses Ergebnis kann durch einschlägige Studien bestätigt werden. Beispielsweise lag in einer Untersuchung nach Kruse und Bredell das durchschnittliche Alter der männlichen erkrankten Personen bei 61,04 Jahren, die Frauen waren mit im Schnitt 65,36 Jahren älter. (Kruse et al, 2011) Diese Tendenz findet sich auch in der Studie von Schwager und Nebel: Das mittlere Alter der Männer lag hier bei 55,1 Jahren, das mittlere Alter der Frauen bei 56,6 Jahren. (Schwager et al, 2000) Ein Großteil der erkrankten



Personen gehörte den Altersgruppen von 51 bis 55 und 55 bis 60 an. In der vorliegenden Arbeit wurde dieses Ergebnis bestätigt, wobei der Altersgipfel der weiblichen erkrankten Personen innerhalb der Altersgruppe von 51 bis 60 Jahren und der Altersgruppe von 71 bis 80 Jahren zu finden war, jener der männlichen Studienteilnehmenden lag hingegen in der Gruppe von 61 bis 70 Jahren.

Nur wenige Studien widersprechen den Erkenntnissen dieser Arbeit. In der Untersuchung von Pellitteri wird das mittlere Alter unter den Männern mit 61,7 Jahren angegeben, die erkrankten Frauen sind mit durchschnittlich 58,5 Jahren hingegen jünger. (Pellitteri et al, 1997) Diese Studie bezieht sich auf Daten, die zwischen 1987 und 1992 erhoben wurden, und stellt eine seltene Abweichung in der geschlechtlichen Altersverteilung bei einem oralen Plattenepithelkarzinom dar. In vielen Arbeiten wird bei der Betrachtung des mittleren Erkrankungsalters nicht zwischen den Geschlechtern unterschieden, stattdessen wird das mittlere Alter der Gruppe angegeben, in der sich die meisten erkrankten Personen befinden. Ein mittleres Erkrankungsalter ab 50 oder älter als 65 Jahre (Shiboski et al, 2000) sowie um die 55 Jahre findet sich hierbei am häufigsten. (El-Husseiny et al, 2000; Kessler et al, 2007) Das mittlere Alter der erkrankten Personen, unabhängig vom Geschlecht, tendiert zu immer niedrigeren Werten. Dies verdeutlichen die Ergebnisse einer Studie von Pericot und Escriba, in der ein großer Anteil der Teilnehmenden (42,9 %) 55 Jahre alt war und nur ein geringer Anteil bereits das 65. Lebensjahr überschritten hatte. (Pericot et al, 2000) In einer weiteren Untersuchung wird sogar ein mittleres Alter um das 30. Lebensjahr bei der Ersterkrankung beschrieben. (Shiboski et al, 2000) Dies könnte in zunehmenden Risikofaktoren wie frühzeitigem Nikotin- und Alkoholkonsum sowie in einer steigenden Anzahl HPV-Infizierter begründet liegen. Die Tendenz, in einem jüngeren Alter zu erkranken, wurde in einer Studie aus dem Jahr 2013 belegt. Dabei entsprach das mittlere Erkrankungsalter der Männer annähernd dem der Frauen. (Diajil et al, 2013; Löhler et al, 2014)

## 4.2 Tumor und Metastasen

### 4.2.1 Staging

Bei der Betrachtung der Tumorgröße hatten 18,2 % der erkrankten Personen das Stadium T1, 32,7 % das Stadium T2; das Stadium T3 war mit 5,5 % vertreten und T4 mit 38,2 %. Bei den restlichen 5,4 % wurden keine Angaben zur Tumorgröße gemacht oder diese war nicht beurteilbar. Beim Nodal-Status zeigte sich eine Verteilung von 45,5 % (N0) > 30,9 % (N2) > 12,7 % (N1) > 1,8 % (N3). Bei 9,1 % war der Lymphknotenstatus nicht beurteilbar oder es existierten keine Angaben zum Befall der Lymphknoten. Beim Grading zeigten 70,9 % der Erkrankten mäßig differenzierte Tumore mit dem Stadium G2 noch vor dem Stadium G3, das 20 % der erkrankten Personen aufwiesen. Das Stadium G1 war nur bei 7,3 % der Studienteilnehmenden zu finden und undifferenzierte Tumoren mit dem Stadium G4 zeigten nur 1,8 % der erkrankten Personen. Bei 56,4 % bestand histologisch kein Nachweis eines Residualtumors. Mikroskopisch konnte zu 12,7 % Tumorgewebe am Resektionsrand gefunden werden, makroskopisch zeigte sich in keinem der Fälle ein Residualtumor. Bei 30,9 % der Versuchspersonen existierten keine Angaben zum Resektionsrand oder der Status des Resektionsrands konnte nicht beurteilt werden. Bei 20 % der erkrankten Personen waren die Lymphgefäße infiltriert. Ein Befall der Nervenbahnen wurde bei 14,5 % aller Teilnehmenden nachgewiesen. Bei 21,8 % der 55 erkrankten Personen wurde dokumentiert, dass keine extrakapsuläre Ausdehnung von Lymphknotenmetastasen stattgefunden hatte, bei 14,5 % konnte hingegen ein extrakapsuläres Wachstum der Lymphknotenmetastasen bestätigt werden. Zur Invasion ins venöse Blutgefäßsystem wurden keine Angaben gemacht. Bei keinem der 55 erkrankten Personen war eine Fernmetastasierung dokumentiert.

Die Klassifizierung nach den häufigsten Komponenten des TNM-Systems – T, N und G – wird in der einschlägigen Literatur vielfach vorgenommen. Hingegen werden die Variablen M, R, und L nur selten erfasst und demnach auch nur selten ausgewertet.

Es finden sich in der Literatur Resultate von 44,4 % (T1) > 21,3 % (T2) > 17,0 % (T4) > 8,5 % (T3). (Girardi et al, 2013) In der Studie nach Akhter et al. entspricht die Reihenfolge T2 > T1 > T3 > T4. (Akhter et al, 2011) Eine Datenerhebung aus dem Jahr 2011 brachte folgendes Ergebnis: 46,6 % (T1), 29,8 % (T2), 5,6 % (T3) und 18,4 % (T4). (Gerber et al,

2011) In einer weiteren Studie wird von 35 % (T2), 29 % (T1), 27 % (T3) und 9 % (T4) gesprochen (Joo et al, 2013) Häufig findet sich in der Literatur eine Reihenfolge wie  $T1 > T2 > T4 > T3$ . In der vorliegenden Arbeit wurde hingegen der prozentual größte Anteil mit 38,1 % von T4 gebildet, T1 hatte mit 18,1 % einen eher geringen Anteil. Auch in der Studie nach Kessler hat T4 den größten prozentualen Anteil an allen Stadien. (Kessler et al, 2007) Die Ergebnisse dieser Arbeit spiegeln die Tendenz in der Vergangenheit wider, wonach bei einem Großteil der an einem oralem Plattenepithelkarzinom erkrankten Personen erst ein verspäteter Arztkontakt stattfand und demnach auch das Tumorleiden in einem fortgeschrittenen Krankheitsstadium (T4) therapiert wurde. (Vokes et al, 1993) Häufigere zahnärztliche Kontrolluntersuchungen und ein sensibilisierter Patient führen dazu, dass viele Tumoren schon im Stadium T1 oder T2 entdeckt und therapiert werden.

Bezüglich des N-Stagings wird in der Literatur angeführt, dass 36,2 % der Erkrankten das Stadium N1 aufwiesen, weniger das Stadium N2 und nur 3,4 % der Betroffenen das Stadium N3 zeigten. (Pericot et al, 2000) In weiteren Studien hingegen wird der prozentual größte Anteil vom Stadium N0 gebildet, danach folgen N2 und N1 und zuletzt N3. (Linton et al, 2013) Diese Tendenz zeigte sich auch in dieser Arbeit mit einem N0-Anteil von 45,5 % vor dem N2-Stadium mit 30,9 %, gefolgt vom N1-Stadium mit 12,7 % und zum Schluss N3 mit 1,8 %. Eine andere Untersuchungsreihe lieferte ebenfalls den prozentual größten Anteil bei N0 mit 59 %, gefolgt von N1 mit 21 %, N2 mit 19 % und zuletzt N3 mit 1 %. (Li et al, 2013)

Zudem finden sich in der Literatur Ergebnisse bezüglich der Differenzierung des Karzinomgewebes, wobei 60,7 % der erkrankten Personen ein G2-Stadium zeigten, 23,6 % ein G3-Stadium und nur 15,7 % ein G1-Stadium. (Gerber et al, 2011) Poeschl und Russmueller kommen zu Resultaten mit einer prozentualen Häufigkeit von 57 % der Erkrankten im Stadium G2, 22 % der Betroffenen im Stadium G3 und 21 % der erkrankten Personen im Stadium G1. (Poeschl et al, 2011) Auch in den Studien nach Keski-Säntti et al. ist das Stadium G2 der am häufigsten vorkommende Differenzierungsgrad. (Keski-Säntti et al, 2007) Diese Angaben aus der Literatur entsprechen der Reihenfolge dieser Arbeit mit 70,9 % (G2) > 20 % (G3) > 7,3 % (G1) > 1,8 % (G4). Das hier aufgeführte Stadium G4, bei dem das Tumorgewebe schlecht differenziert ist, wird in zahlreichen Studien jedoch nicht

berücksichtigt. Es gibt allerdings auch Untersuchungen, in denen eine abweichende prozentuale Verteilung mit einem G2-Stadium von 46 % beschrieben wird, gefolgt von einem G1-Stadium mit 44 % und einem niedrigen G1-Stadium von 10 %. (Akhter, et al, 2011) Wie im Ergebnisteil der vorliegenden Arbeit beschrieben wurde, ist die häufigste prozentuale Verteilung bezüglich der Tumordifferenzierung die Reihenfolge  $G2 > G1 > G3$ . (Joo et al, 2013) Daraus kann gefolgert werden, dass sich bei der Diagnosestellung am häufigsten ein Tumor im G2-Stadium findet.

Anders als zum T-, N- und G-Staging finden sich zu den kategorialen Variablen – M, R und L – wenige Angaben in der Literatur. Die Häufigkeit von Fernmetastasen ist laut einer Studie von Kessler und Grabenbauer gering. (Kessler et al, 2007) Dies entspricht dem Ergebnis dieser Arbeit, wonach bei keinem der 55 Patienten Fernmetastasen bekannt waren. In der Studie von Garden wird der prozentuale Anteil eines R1-Stadiums als gering angegeben; dies bestätigt auch das Resultat dieser Arbeit mit einem R1-Stadium von 12,7 %. (Garden et al, 2004) Weiter wird in einer einschlägigen Studie die Lymphbahninvasion mit einem Anteil von 8,33 % beschrieben (Joo et al, 2013), in einer weiteren belief sich die Lymphgefäßinvasion sogar auf 34,8 % (Jones et al, 2009). Das L1-Stadium in dieser Arbeit lag mit einem Anteil von 20 % zwischen diesen Werten.

Aus diesen Literaturangaben kann geschlussfolgert werden, dass bei einem Großteil der oralen Plattenepithelkarzinome kein Residualtumor am Resektionsrand nachzuweisen ist, Fernmetastasen nur in wenigen Fällen diagnostiziert werden und eine Lymphgefäßbeteiligung ebenfalls selten vorkommt. Dieser Sachverhalt spiegelt die Tendenz der Ergebnisse dieser Arbeit wider.

## 4.3 Zirkulierende Tumorintegrine in der Karzinomdiagnostik

### 4.3.1 Stellenwert der Methode im klinischen Kontext

Ein individuell auf die erkrankte Person abgestimmtes Behandlungskonzept stellt eine der größten Herausforderungen in der Therapie maligner Tumorerkrankungen dar und ist gleichzeitig Voraussetzung für eine möglichst hohe Lebensqualität und einen optimalen Allgemein- und Gesundheitszustand der Betroffenen während der Krankheitsphase.

(Doroshov & Parchment, 2008; Kuhlman & Wensing, 2006) Inzwischen wurden viele Tumorgene auf molekularer Ebene erforscht und die Angriffspunkte der Pharmaka in der Krebstherapie sind teilweise bekannt. (Kan et al, 2010) Aus diesem Grund ist es notwendig, eine Krebserkrankung in einem möglichst frühen Stadium zu diagnostizieren, um den Betroffenen eine gezielte Tumorthherapie anbieten zu können, was in einem fortgeschrittenen Stadium der Erkrankung oftmals nicht mehr möglich ist. Um dieses Ziel zu realisieren, gewinnt die Isolierung von Tumorzellen aus dem peripheren Blut erkrankter Personen (CTC) zunehmend an Bedeutung und ist Fokus der Krebs- und Arzneimittelforschung. (Maheswaran et al, 2008) Das Isolieren und Zählen der peripheren Tumorzellen birgt das Potential eines prognostischen Tumormarkers, der Hinweise auf das Tumorstadium und das Ansprechen der erkrankten Personen auf die individuelle Therapie liefern kann. (Dotan et al, 2009; Krebs et al. 2010) Ein Vorteil der sogenannten Liquid-Biopsie liegt darin, dass durch die Probeentnahme und Untersuchung von flüssigen biologischen Substanzen (beispielsweise Blut) ein weniger invasives Diagnoseinstrument als bei der klassischen, häufig in Narkose durchgeführten Gewebebiopsie geschaffen wird.

Über die letzten Jahre wurden zahlreiche Methoden zur Gewinnung und Zählung der zirkulierenden Tumorzellen erforscht und entwickelt. (Hou et al, 2011) Eine der erfolgreichsten davon ist die immunomagnetische Trennung. Bei dieser erfolgt die positive Selektion der CTCs durch Antikörper, die vom Tumor exprimierte Epithelial-Cell-Adhesion-Molecule-Antigene erkennen. (Christofanilli et al, 2004) Da eine Korrelation zwischen Anhäufungen von CTCs und einem steigenden metastatischen Potential bekannt ist, werden bei Cluster-Chip-Methoden sich verzweigende Mikrofluss-Klappen genutzt, die die Cluster der CTCs aus dem langsam fließenden Blut filtern. (Sarioglu et al, 2015) Filtrationsmethoden wie CTC-iChip können erfolgreich Non-CTCs wie rote Blutkörperchen entfernen. (Ozkumur et al, 2013) Während alternative Methoden mittels Mikrofluss-Chips die CTCs nach Größe und Verformbarkeit in entsprechenden Kammern sortieren (Riahi et al, 2014), werden bei anderen Methoden Membranfilter herangezogen, um die CTCs nach der Größe zu isolieren. (Desitter et al, 2011) Auch PCR-Methoden spielen bei der Isolierung der peripheren Tumorzellen eine große Rolle (Iakovlev et al, 2008) und wurden in dieser Arbeit zum Nachweis der mRNA der  $\beta 6$ -Untereinheit des Tumorintegrin  $\alpha \beta 6$  eingesetzt.

Bis dato wurden zahlreiche Studien zur Etablierung eines geeigneten Tumormarkers in der Diagnostik des oralen Plattenepithelkarzinoms durchgeführt.

In einer Untersuchung von Rai und Ahmed wurde gezeigt, dass die Expression von N-Cadherin umso höher ist, je schlechter der Tumor differenziert ist. Deshalb wird N-Cadherin als möglicher Tumormarker diskutiert. (Rai & Ahmed, 2019) Bei der EMT verlieren die epithelialen Zellen ihre Zellpolarität und ihre Verbindungen zu benachbarten Zellen. Bei diesem Vorgang werden sie in mesenchymale Zellen mit der Fähigkeit zur Migration und Invasion umgewandelt. Vor allem die adhärenen Zellverbindungen sichern die Gewebintegrität und die Zellpolarität; die Cadherine als Transmembranmoleküle spielen dabei eine große Rolle, wobei E-Cadherin von den epithelialen Zellen und N-Cadherin von den mesenchymalen Zellen exprimiert wird. (Spaderna et al, 2008; Yang & Weinberg, 2008) Da Karzinomzellen die EMT durchlaufen und das Transmembranprotein N-Cadherin dabei relevant ist, wird ihm ein potentieller Wert als Tumormarker zugeschrieben.

In einer Studie von Tada et al. wurden zirkulierende Tumorzellen, die durch Mikrofilter isoliert wurden, auf die Expression epithelialer Marker (Epithelial Cell Adhesion Molecule, MET, Cytokeratin-19, EGFR) mittels RT-qPCR untersucht. Bei 64 % der 44 Patienten mit einem diagnostizierten oralen Plattenepithelkarzinom konnte mindestens einer der epithelialen Faktoren nachgewiesen werden. Die CTC-positiven Proben wurden an weiteren Genen wie SNAI<sub>1</sub>, VIM und CD<sub>274</sub> untersucht. Der Nachweis zirkulierender Tumorzellen korrelierte mit einer höheren Therapieresistenz, häufigeren Lokalrezidiven und einem kürzeren progressionsfreien Überleben. Vor allem der Nachweis von MET in den CTCs korrelierte mit einem verkürzten progressionsfreien Überleben, hingegen zeigten CD<sub>274</sub>-positive CTCs ein verlängertes progressionsfreies Überleben. Aus der Studie ging damit hervor, dass das in der Genexpression der zirkulierenden Tumorzellen charakterisierte molekulare Profil zahlreiche klinische Faktoren beeinflusst. (Tada et al, 2020)

Weiterhin wurde von Mazumder der Einsatz von zirkulierenden Micro-RNAs (MiRNAs) als nichtinvasive Biomarker für Mundhöhlenkarzinome untersucht. Die MiRNAs sind einer der bedeutendsten Bestandteile der zellfreien Nukleinsäuren, die in den meisten Körperflüssigkeiten vorkommen. Demnach eignen sich die MiRNAs mir-371, mir-150, mir-21 und mir-7d als potentielle Tumormarker. Während das vermehrte Vorkommen von mir-

134, mir-146a und mir-338 mit dem Vorhandensein von Metastasen korreliert, zeigte sich bei einer erhöhten Konzentration von mir-21 und mir-7d signifikant häufiger eine Resistenz gegenüber einer Chemotherapie. Trotz der vielversprechenden Aussicht, zirkulierende MiRNAs zukünftig als Tumormarker einsetzen zu können, bleibt es herausfordernd, deren exakte Steuerung zu entschlüsseln, bevor sie als zielorientiertes Diagnoseinstrument eingesetzt werden können. (Mazumder et al, 2019)

Es konnte keine Studie identifiziert werden, in der das Integrin  $\alpha\beta6$  als zirkulierender Tumormarker in der Diagnostik des oralen Plattenepithelkarzinoms untersucht wurde. In der vorliegenden Arbeit wurde die Funktion der mRNA der  $\beta6$ -Untereinheit des Integrin  $\alpha\beta6$  als prognostischer Marker untersucht, um die Möglichkeiten zu optimieren, ein orales Plattenepithelkarzinom zukünftig früher und genauer zu diagnostizieren, und gleichzeitig einen geeigneten Marker zur Therapieüberwachung zu etablieren.

Es ist bereits bekannt, dass bei malignen Tumoren wie Kolon-, Lungen-, Zervikal-, Ovarial- oder Pankreaskarzinomen eine Überexpression des Integrin  $\alpha\beta6$  vorliegt. Von gesunden Organen wird das Integrin  $\alpha\beta6$  nur in geringer oder nicht messbarer Menge exprimiert. (Bandyopadhyay & Raghavan, 2009) Deshalb wird die erhöhte Expression von mRNA der  $\beta6$ -Untereinheit des Integrin  $\alpha\beta6$  als prognostischer Faktor bei erwähnten Tumorerkrankungen betrachtet und korreliert mit dem Vorhandensein von malignen Prozessen und einer schlechten Prognose. (Bates et al, 2005; Hazelbag et al, 2007)

#### 4.3.1.1 Bedeutung der zirkulierenden Tumorgene für die erkrankten Personen

Eine gute Prognose mit einem kurativen Behandlungsausgang ist von einer frühen Diagnostik und einer geringen Tumorausdehnung abhängig. Liegt bei einer Person der Verdacht eines oralen Plattenepithelkarzinoms nahe, wird diese meist an eine Fachklinik für Mund-Kiefer- und Gesichtschirurgie weitergeleitet, um den Befund eines oralen Plattenepithelkarzinoms beziehungsweise die Differentialdiagnose zu bestätigen. Die Tumorsuche erfolgt durch Anamnese, klinische Untersuchung, Bildgebung und Gewebeprobeentnahme. Wird der Verdacht bestätigt, kann anhand der diagnostischen Mittel eine vorläufige Klassifizierung des Tumors erfolgen. Diese wird mit dem Präfix *c* gekennzeichnet, da sie

klinisch vor der großen Tumoroperation erstellt wird. Wird das Staging durch die Bestimmung eines Tumormarkers ergänzt, ist eine Blutabnahme unter ambulanten Bedingungen ausreichend, um das Probenmaterial zu gewinnen. Das Ergebnis liefert eine erste Orientierung bezüglich des Verdachts. Ein ungewöhnlich hoher Wert kann darauf hinweisen, dass sich das Tumorwachstum bereits in einem fortgeschrittenen Stadium befindet und weitere Maßnahmen möglichst schnell eingeleitet werden sollten. Insbesondere nach erfolgter Therapie würden die betroffenen Personen von einem im Blut zirkulierenden Verlaufsparemeter profitieren. Die am Nachsorgeprogramm Teilnehmenden können ambulant überwacht werden, indem in regelmäßigen Abständen Blut abgenommen und darin der Tumormarker bestimmt wird. Ein erhöhter Wert kann frühzeitig auf ein Tumorrezidiv hinweisen.

Allerdings kann es bei der Bestimmung des Tumorintegrin auch zu falsch positiven Werten kommen. Insbesondere bei unbekanntem Entzündungsprozessen im Körper kann der Wert ebenfalls erhöht sein. Die Annahme, an einem fortgeschrittenen Tumorleiden erkrankt zu sein, führt bei den Betroffenen im Falle eines falsch positiven Ergebnisses zu einer schweren psychischen Belastungssituation und kann das Vertrauen in die Therapie und das Nachsorgeprogramm schwächen.

#### 4.3.1.2 Zirkulierende Tumorgene als diagnostisches Mittel für die behandelnde Person

Die Erstvorstellung einer Person mit Verdacht auf ein orales Plattenepithelkarzinom erfolgt oftmals in der haus- oder zahnärztlichen Praxis, dabei kann es zu Fehlinterpretationen eines auffälligen Schleimhautbefunds kommen. Der Betroffene stellt sich mit einem Fremdkörpergefühl oder Schmerzen vor und die veränderte orale Schleimhautirritation wird als gutartig eingestuft. Deshalb werden oft keine weiteren diagnostischen Schritte unternommen und es erfolgt eine Wiedereinbestellung der betroffenen Person zur Verlaufskontrolle. In einer Kontrolluntersuchung zu einem späteren Zeitpunkt ist die orale Schleimhautveränderung immer noch vorhanden oder hat sich bereits ausgedehnt. Wertvolle Zeit geht verloren, in der eine Therapie bereits hätte begonnen werden können, und der Diagnosezeitpunkt verzögert sich damit um einige Wochen oder sogar Monate. Die ambulanten Behandler in einer Hauszahnarztpraxis empfinden es als voreilig, die betroffene Person wegen einer



harmlos erscheinenden Schleimhautveränderung mit Tumorverdacht in eine Fachklinik zu überweisen. Hingegen stellt es einen einfachen diagnostischen Handlungsschritt dar, eine Blutabnahme durchzuführen und die Blutprobe an ein Fachlabor weiterzuleiten, in dem diese auf zirkulierende Tumormarker untersucht werden kann. Je nach Ergebnis wird eine Weiterüberweisung der betroffenen Person in eine Fachklinik eingeleitet oder es erfolgt die Beobachtung des Befunds mit Wiedereinbestellung in wenigen Wochen. Der Tumormarker im Blut stellt ein direkt ambulant anwendbares wegweisendes Diagnoseinstrument dar und kann die Rate der Karzinome mit schlechter Prognose aufgrund hoher TNM-Klassifikation zum Diagnosezeitpunkt reduzieren.

#### 4.3.1.3 Bedeutung der zirkulierenden Tumorgene für die Klinik

Der Einsatz eines Tumormarkers, der mit der Optimierung des Behandlungserfolgs bei den erkrankten Personen, mit dem rechtzeitigen Erkennen von Rezidiven und mit einer Reduktion von langen Krankenhausaufenthalten einhergeht, hat zum vordergründigen Ziel, den Betroffenen ein bestmögliches Therapiekonzept zu bieten.

Liegt der Verdacht eines oralen Plattenepithelkarzinoms nahe, kommt es üblicherweise zur Überweisung in eine Fachklinik, um das Staging-Programm im ambulanten Rahmen durchzuführen. Je fortgeschrittener das Stadium der Tumorerkrankung ist, desto aufwendiger und umfassender ist das Therapiekonzept – angefangen bei einem großen operativen Eingriff mit Tumorentfernung und einer umfangreichen rekonstruktiven Sanierung bis hin zu einer langen Nachbehandlungszeit mit Bestrahlung und Rehabilitation. Pro Liegetag der erkrankten Person entstehen Kosten. Die Etablierung eines Diagnoseinstruments, das die Messung eines Tumormarkers beinhaltet, der in einer ambulant durchgeführten venösen Blutabnahme gewonnen wird, kann dazu beitragen, orale Plattenepithelkarzinome sowie deren Rezidive in einem frühen Stadium zu diagnostizieren. Stationäre Krankenhausaufenthalte können damit verkürzt und hohe Kosten durch lange Liegezeiten reduziert werden, da die Behandlung eines oralen Plattenepithelkarzinoms in einem frühen Stadium weniger invasiv und seltener mit Komplikationen verbunden ist.

Demgegenüber kann sich durch den Einsatz eines Tumormarkers auch eine gegenläufige Tendenz abzeichnen: Etabliert sich in Zukunft die Abnahme des Tumorintegrin bei

Verdacht auf ein orales Plattenepithelkarzinom als Erstmaßnahme, kann es dabei auch zu gehäuftem Auftreten falsch positiver oder negativer Testergebnisse kommen. Um nach wie vor eine zuverlässige Diagnose stellen zu können, wird deshalb das bewährte Staging-Verfahren beibehalten. Der Tumormarker wird als zusätzliche Maßnahme bestimmt, ohne den Staging-Prozess nachhaltig zu verändern oder zu optimieren. Vielmehr fallen durch die Bestimmung des Tumoringegrin weitere Kosten an. Die Untersuchung stellt einen zeitaufwendigen Prozess dar, in dem mehrere Arbeitsschritte hintereinander durchgeführt werden müssen und teure Verbrauchsmaterialien erforderlich werden. Deshalb erfordert das Verfahren zur Bestimmung eines Tumormarkers einen kostspieligen Aufwand.

## 4.4 Methode und Technik

### 4.4.1 Kritische Aspekte bei der Probengewinnung und -aufbereitung

Bevor eine Methode als diagnostisches Routineverfahren etabliert werden kann, wird eine kritische Betrachtung der methodischen Aspekte bezüglich der Probengewinnung und Aufbereitung vorausgesetzt. In diesem Abschnitt werden die Vermeidung möglicher Fehlerquellen bei der Probeentnahme und das korrekte Vorgehen bei den einzelnen Arbeitsschritten, etwa bei der RNA-Isolierung, der cDNA-Umschreibung und der PCR, diskutiert.

#### 4.4.1.1 Blutentnahme

Das verwendete Plasma wurde bei der Gruppe der erkrankten Personen am Vortag der Operation durch eine Venenpunktion entnommen, die ausschließlich für diese Studie erfolgte. Bei der Kontrollgruppe wurde es teils in einer zusätzlichen Monovette im Rahmen einer Routineblutentnahme und teils ebenfalls in einer separaten Venenpunktion gewonnen. Die Kontamination der Blutprobe mit epithelialen Zellen ist am wahrscheinlichsten, wenn zuerst das Serumröhrchen zur RNA-Isolierung abgenommen wurde, wie es in beiden Gruppen teilweise der Fall war. Die Verunreinigung der Blutentnahme durch Hautzellen kann eine Ursache für falsch positive Ergebnisse sein. (Gilbey et al, 2004) Die erhöhte Expression von mRNA der  $\beta 6$ -Untereinheit des Integrin  $\alpha \nu \beta 6$ , gerade auch in den Blutproben der gesunden Probanden, kann durch dieses Vorgehen verursacht worden sein. Bei zukünftigen

Studien sollte diesem Fehler vorgebeugt werden, indem bei der Blutentnahme zur RNA-Isolierung das erste Röhrchen verworfen wird.

#### 4.4.1.2 Gewinnung des Buffy-Coats

Die RNA-Isolierung erfolgte vor allem aus dem Buffy-Coat. Dazu wurden durch Zentrifugation die Erythrozyten vom Blutplasma getrennt; dazwischen entstand eine dünne Schicht aus Leukozyten und Thrombozyten, die als *Buffy-Coat* bezeichnet wird. Nach Möglichkeit sollte ausschließlich der Buffy-Coat pipettiert werden, um diesen nach einigen Reinigungsschritten in einem Gemisch aus RNA-Later und PBS bei  $-80\text{ °C}$  zu lagern und zu einem späteren Zeitpunkt der RNA-Isolierung zuzuführen. Das Pipettieren des Buffy-Coats stellt einen herausfordernden Arbeitsschritt dar, da dieser als dünne Schicht über den Erythrozyten schwimmt und durch die Pipettenspitze rote Blutzellen aufgewirbelt werden können. Die Trennung von den zellulären Bestandteilen ist allerdings für eine erfolgreiche RNA-Extraktion eine Voraussetzung, da die Erythrozyten beim Tiefrieren zur kompletten Hämolyse gebracht werden. Bei diesem Vorgang setzen sich Enzyme aus den roten Blutkörperchen frei und können ihrerseits wieder die RNA abbauen oder deren Isolierung verhindern. (Enders, 2020)

#### 4.4.1.3 RNA-Isolierung

Durch die Zirkulation von Proteinen im Blut ist die RNA-Isolation aus Plasma oder Serum gegenüber anderen Medien schwieriger. (El-Hefnawy et al, 2004) Die zur RNA-Isolierung eingesetzten Puffer werden durch die Pufferkapazität der Proteine beeinflusst und in ihrer Arbeitsleistung folglich eingeschränkt. In dieser Arbeit erfolgte die RNA-Isolierung mit RNeasy®-Mini-Säulen. Die Ribonukleinsäuren absorbieren ab einer Länge von 200 Basenpaaren an einer speziellen Silicamembran, die sich innerhalb der Säulen befindet. Die Effizienz dieser Absorption steigert sich mit zunehmender Größe der gefilterten Moleküle. Die zirkulierende RNA liegt in Teilen fragmentiert vor. Daraus kann gefolgert werden, dass die fragmentierten Ribonukleinsäuren erschwert in der Silicamembran gebunden werden und daraus ein Nachteil bei der RNA-Präparation entsteht. Laut El-Hefnawy kann die größte effektive Ausbeute fragmentierter Plasma-RNA durch eine Präzipitation innerhalb

einer Phenol-Chloroform-Extraktion erzielt werden. Die hier verwendete Membran aus Silica führte jedoch nach vorliegenden Ergebnissen zu einer deutlich geringeren Ausbeute. (El-Hefnawy et al, 2004)

#### 4.4.1.4 Photometrische Messung

Die Beurteilung der Qualität der gewonnenen RNA-Proben stellt generell eine Herausforderung dar. Durch photometrische Messung kann die Reinheit des RNA-Materials beurteilt werden, nicht jedoch der Grad der Degradierung. Zu diesem Zweck kann eine Elektrophorese durchgeführt werden, bei der sich bei ausreichender Qualität des RNA-Isolats zwei typische Banden auf dem Agarose-Gel zeigen (18S und 28S). Sie stehen für die rRNA, die den prozentual größten Anteil unter den RNA-Fractionen darstellt. Wenn die Banden 28S und 18S in einem bestimmten Verhältnis vorliegen, spricht dies für eine qualitativ hochwertige RNA. (Schroeder et al, 2006) Das Verfahren der Gelelektrophorese kann allerdings nicht als objektives Beurteilungsinstrument herangezogen werden, da es stark von der Einschätzung des Untersuchers abhängt.

Um den Grad der Degradierung des RNA-Isolats objektiv zu beurteilen kann eine chipbasierte Technologie eingesetzt werden. Durch Kapillarelektrophorese und laserinduzierte Fluoreszenz werden die einzelnen Fragmente der RNA sichtbar gemacht und die RNA-Qualität kann reproduzierbar gemessen werden. (Bustin, 2002)

#### 4.4.1.5 cDNA-Synthese

Verglichen mit der PCR sind die Reaktionen der cDNA-Umschreibung mit einer höheren Fehlerwahrscheinlichkeit behaftet. Unterschiedlich starke Arbeitsleistungen der Primer, mögliche Störvariablen in den biologischen Medien und die Sekundär- sowie Tertiärstruktur der RNA beeinflussen die Effizienz der reversen Transkription.

Es gibt zahlreiche Optionen, um den Prozess einer erfolgreichen cDNA-Synthese zu optimieren. In dieser Arbeit wurde die RNA vor der eigentlichen cDNA-Synthese durch eine fünfminütige Inkubation bei 65 °C denaturiert. Dieses Vorgehen führte zum Aufbrechen von inter- und intramolekularen Sekundärstrukturen. Gelangt die zuvor denaturierte RNA

in einen Reaktionspuffer zurück, können insbesondere Stamm-Schleife-Strukturen abgebaut werden. Durch eine geringe Konzentration an RNA und entsprechende Denaturierungsvorgänge werden intermolekulare Wechselwirkungen der RNA auch dauerhaft gesenkt. Demnach lässt sich festhalten, dass die cDNA-Umschreibung an den Hairpin-Strukturen durch eine vorangehende RNA-Denaturierung erleichtert wird.

Die Reaktionstemperatur betrug im Rahmen dieser Arbeit 42 °C. Um die Denaturierung der RNA-Sekundärstruktur zu verstärken, die Zugänglichkeit der RT im cDNA-Syntheseprozess zu erhöhen und folglich die cDNA-Qualität zu steigern, könnte die Reaktionstemperatur jedoch auf 50 bis 60 °C angehoben werden. Demgegenüber nimmt die Enzymaktivität mit steigender Temperatur ab, was eine geringere Ausbeute durch eine herabgesetzte Arbeitsleistung der RT zur Folge hat. Da die Primer für die cDNA-Umschreibung meist geringere Schmelztemperaturen aufweisen, lösen sie sich von der RNA ab. Durch Durchführung der cDNA-Synthese mit einer RT, die eine starke Bindung zum cDNA-RNA-Hybrid aufweist, kann diesem Problem entgegengewirkt werden. (Jansohn & Rothhämel, 2012)

#### 4.4.1.6 PCR

Die PCR gilt als empfindlich. Eines der größten Probleme stellt die Kontamination der Proben dar. Infolgedessen besteht die Gefahr, dass Primer vor und während der PCR unspezifisch hybridisieren und daraus falsch positive Ergebnisse resultieren. Die Probe kann durch DNA-Partikel der im Labor tätigen Personen, durch externe Faktoren wie verschmutzte Arbeitsflächen oder durch mikrobielle Keime kontaminiert werden. Um Verunreinigungen der DNA zu reduzieren, indem die unerwünschten Partikel im Reaktionsansatz abgebaut werden, kann dem PCR-Ansatz Uracil-N-Glykosylase hinzugefügt werden. (Pruvost et al, 2005) Diese baut allerdings auch PCR-Produkte ab, die Uracil enthalten, und es kann dadurch zu falsch negativen Ergebnissen kommen. (Bacich et al, 2011)

Zahlreiche weitere Faktoren können zu Fehlern im Ablauf der PCR führen. So können sich beispielsweise in der Verwendung einer ungeeigneten thermostabilen Polymerase, in zu hohen oder zu niedrigen Konzentrationen von Substraten oder Produkten, in einer falschen Primer-Sequenz, im Vorhandensein von Substrat-Inhibitoren oder in Abweichungen von

der optimalen Arbeitstemperatur Fehlerquellen verbergen, die eine Störung des PCR-Vorgangs zur Folge haben.

Die für eine PCR benötigte DNA-Polymerase kann vor allem aus thermophilen Bakterien und Archaeen gewonnen werden. Da zahlreiche Polymerasen existieren, ist die Auswahl der geeigneten DNA-Polymerase von großer Bedeutung, um eine ausreichende Synthesemenge zu gewährleisten.

Von der Wahl der DNA-Sequenz der Primer ist die Annealing-Temperatur abhängig. Darunter wird die Temperatur verstanden, bei der die Primer hybridisieren. Sie ist gewöhnlich 2 °C niedriger als die Schmelztemperatur der Primer. Die Herausforderung besteht darin, eine Temperatur zu finden, bei der die Primer sowohl vollständig hybridisieren als auch möglichst spezifisch an die DNA-Sequenz binden.

Um möglichst optimale Bedingungen während der PCR zu gewährleisten, sollten die Substratkonzentrationen innerhalb folgender Zielbereiche liegen. Dies entspricht einer Primer-Endkonzentration von 0,1 bis 1 µM. Die dNTP-Konzentration sollte für jede der vier Basen – Adenin, Guanin, Thymin und Cytosin – zwischen 100 und 1000 µM liegen, die DNA-Konzentration pro Mikroliter des PCR-Ansatzes zwischen 1 und 20 ng.

Bei einer Temperatur von 95 °C denaturiert der DNA-Doppelstrang, danach kommt es zur Primer-Hybridisierung bei entsprechender Annealing-Temperatur. Die Neusynthese der DNA erfolgt zuletzt bei einem Temperaturoptimum der eingesetzten thermostabilen DNA-Polymerase (ca. 70 °C). Um einen reibungslosen PCR-Ablauf zu gewährleisten, ist die Einhaltung der Temperaturzyklen mit Anpassung an das Arbeitsoptimum der verwendeten Primer und Polymerasen eine Voraussetzung.

Substanzen wie Heparin, Hämoglobin, EDTA, Harnsäure und Melanin zählen zu den PCR-Inhibitoren, indem sie die Arbeitsleistung der thermostabilen DNA-Polymerase beeinträchtigen. (Faber et al, 2013) In der vorliegenden Arbeit wurden die Proben aus Vollblut gewonnen, das in einem EDTA-Röhrchen gesammelt wurde. Deshalb ist es möglich, dass gerade die erwähnten Inhibitoren in den PCR-Reaktionsansatz gelangt sind und ein falsch negatives Ergebnis verursacht haben.

Prinzipiell können sogenannte Hot-Start-Polymerasen wie die Platinum-Taq-Polymerase eingesetzt werden, um die Spezifität der Polymerasen zu erhöhen. Indem somit die Bindung der Polymerase an unerwünschte DNA-Sequenzen am Anfang des ersten Temperaturzyklus gesenkt wird, reduziert sich auch die Bildung eines falschen Reaktionsprodukts. (Arezi et al, 2003) Bei der Platinum-Taq-Polymerase erfolgt die Hemmung durch Andocken eines Antikörpers ans aktive Zentrum, der bei Temperaturen von 95 °C wieder zerfällt. (Paul et al, 2010) Durch den Einsatz der Hot-Start-Polymerasen können falsch negative Ergebnisse vermieden werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde für die quantitative Real-Time-PCR der DNA-bindende Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green I verwendet. Dabei handelt es sich um ein Farbstoffmolekül, das sich hochspezifisch in die kleine Furche der DNA-Doppelhelix einlagert. Die Kennzeichnung sequenzspezifischer Sonden ist bei dieser Methode nicht nötig und die Synthese somit deutlich kostensparender. Dies stellt einen Vorteil des Systems dar. Dass der Nachweis mit SYBR Green I nur mit einer geringen Spezifität gelingt, steht dem als Nachteil gegenüber. Da sich SYBR Green an doppelsträngige DNA-Bestandteile anlagert, bindet er auch an Primer-Dimere und nicht spezifische PCR-Produkte. Dieser Vorgang erhöht ebenfalls das Fluoreszenzsignal und führt zu falschen Ergebnissen der Quantifizierung. Die Spezifität von SYBR Green kann erhöht werden, indem spezielle SYBR-Green-Kits (zum Beispiel QuantiTect<sup>®</sup> SYBR Green Kits, Quiagen) verwendet werden. Diese enthalten eine verbesserte Taq-DNA-Polymerase, die die Bildung von Primer-Dimeren und unspezifischen PCR-Produkten reduziert. (Jansohn & Rothhämel, 2012)

#### 4.4.1.7 Auswahl der erkrankten und gesunden Studienteilnehmenden

Die Blutproben stammten von 55 kranken und 33 gesunden Personen. In der Gruppe der an einem oralen Plattenepithelkarzinom erkrankten Personen befanden sich 33 Männer und 22 Frauen, jene der gesunden Personen setzte sich aus 12 Männern und 21 Frauen zusammen. Insgesamt war die Verteilung zwischen Männern und Frauen mit 45:43 ausgewogen. Das mittlere Erkrankungsalter lag in der Gruppe der Erkrankten bei 63,05 Jahren mit einem Median von 64 Jahren und in der Kontrollgruppe bei 46,88 Jahren mit einem Median von 39 Jahren. Insgesamt betrug das mittlere Erkrankungsalter 56,99 Jahre mit einem Median

von 60 Jahren. Diese Zahlen verdeutlichen, dass die Verteilung der Studienteilnehmenden bezüglich Anzahl, Geschlecht und Alter in der Gruppe der erkrankten Personen nicht der Verteilung in der Kontrollgruppe entsprach. In der Kontrollgruppe befanden sich weniger Personen und diese waren in einem durchschnittlich jüngeren Alter und mit einem größeren Anteil des weiblichen Geschlechts. Die Personen in der gesunden Gruppe wurden von Mitarbeitenden der Arbeitsgruppe des Labors der Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie, im Familien- und Bekanntenkreis und im Rahmen eines Hausarztpraktikums rekrutiert. Da die Verteilung bezüglich Anzahl, Geschlecht und Alter in der Gruppe der erkrankten Personen, schwierig zu beeinflussen war, musste eine ausgewogene Verteilung bezüglich genannter Parameter auf beide Gruppen über die Auswahl der gesunden Personen gesteuert werden. Bei einer Folgestudie mit dem Ziel, die Ergebnisse an einer größeren Kohorte zu überprüfen, muss deshalb auf eine gleichmäßige Verteilung der Parameter Anzahl, Geschlecht und Alter geachtet werden, um Einflüsse auf das Ergebnis durch diese Variablen zu reduzieren. Im Spearman-Rho-Test wurde allerdings in beiden Gruppen kein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Alter und dem Ergebnis festgestellt, sodass davon ausgegangen werden kann, dass zumindest die Variable Alter das Ergebnis nicht entscheidend beeinflusst hat. Darüber hinaus handelt es sich bei der  $\beta_6$ -Untereinheit des Integrin-Dimers  $\alpha v \beta_6$  um ein konserviertes Protein, dessen Nukleotidsequenz sich im Laufe einer großen Zeitspanne nur minimal verändert und unabhängig vom Lebensalter exprimiert wird. In einer erneuten Studie sollte zwar auf eine Ausgeglichenheit bezüglich des biologischen Alters zwischen erkrankten und gesunden Personen geachtet werden, es kann allerdings davon ausgegangen werden, dass die Variable Alter das Ergebnis nicht signifikant beeinflusst.

## 4.5 Beurteilung der extremen Messabweichungen

### 4.5.1 Beurteilung der extremen Messabweichungen bei erkrankten Teilnehmenden

Betrachtet man die graphische Darstellung der Einzelmesswerte (Abbildung 15 und Abbildung 16) und vergleicht die TNM-Klassifikationen nach UICC der Studienteilnehmenden mit einem sehr hohen Wert, fallen insbesondere drei extreme Messabweichungen auf. Die



drei erkrankten Personen mit einem stark erhöhten Wert wurden entsprechend der Stadieneinteilung nach AJCC der Gruppe IV zugeteilt. In dieser Gruppe befindet sich die Tumorerkrankung in einem fortgeschrittenen Stadium. Weiter zeigte sich bei diesen drei erkrankten Personen eine Tumorgöße T2 oder größer und es waren mehrere, mindestens jedoch ein Lymphknoten befallen. Zudem war das Tumorgewebe meist gering differenziert, darüber hinaus zeigte sich bei allen drei Teilnehmenden ein extrakapsuläres Tumorstadium. Folglich ist nicht nur die Tumorgöße ein Indikator für die erhöhte Expression der  $\beta 6$ -mRNA. Häufig zeigen gerade kleine Tumore, die einerseits nach der TNM-Klassifikation dem Stadium T1 zugeordnet werden können, andererseits eine extrakapsuläre Infiltration aufweisen, ein aggressives Wachstumsmuster. Das Expressionslevel von  $\beta 6$ -mRNA kann in Zukunft gegebenenfalls zusätzlich zur Beurteilung der Aggressivität eines Tumors herangezogen werden.

#### 4.5.2 Beurteilung der extremen Messabweichungen bei gesunden Teilnehmenden

Es konnte nachgewiesen werden, dass das Integrin  $\alpha\beta 6$  nicht nur innerhalb der Karzinogenese überexprimiert vorliegt, sondern dass auch ein Anstieg durch Infektionen wie Entzündungs- und Wundheilungsprozesse zu erwarten ist. (Breuss et al, 1995) Bei der Auswahl in der Gruppe der gesunden Personen wurde darauf geachtet, dass bei der Rekrutierung des Kollektivs weder chronische Erkrankungen noch akute Infektionen anamnestisch erhoben wurden. Bei zwei Studienteilnehmenden mit einem stark erhöhten Wert der Expression von mRNA der  $\beta 6$ -Untereinheit des Integrin  $\alpha\beta 6$  konnte im Nachhinein eruiert werden, dass entzündliche Prozesse in der Mundhöhle stattgefunden hatten. Diese infektiösen Vorgänge können die stark erhöhten Werte der gesunden Personen verursacht haben.

## 5 Zusammenfassung

Seit im Blut von krebserkrankten Personen tumorspezifische Nukleinsäuren entdeckt wurden, werden zirkulierende Fragmente tumorassoziierter, genomischer DNA, von MiRNA und von mRNA in Blutproben als Kontroll- und Verlaufsparemeter bei der Betreuung von erkrankten Personen als mögliche diagnostische Ergänzung herangezogen.

Im Rahmen der vorliegenden experimentellen Studie wurden Methoden zur Isolation und Quantifizierung der  $\beta 6$ -mRNA untersucht. Diese kodiert für die  $\beta 6$ -Untereinheit des Integrin-Dimers  $\alpha \beta 6$ . Da diesem eine entscheidende Rolle bei der Tumorentstehung, Gewebeanvasion und Metastasierung zugesprochen wird, wurde in dieser Arbeit untersucht, ob sich das Integrin als potentieller Tumormarker bei der Diagnostik und Nachsorge, der an einem oralem Plattenepithelkarzinom erkrankten Personen, eignet. Es wurde auch analysiert, ob ein Zusammenhang zwischen freien Nukleinsäuren dieses Integrin im Blutplasma der Betroffenen und Prognosefaktoren des Tumors besteht.

Die mRNA-Isolierung erfolgte aus dem Blutplasma von 55 erkrankten Personen mit histologisch gesichertem oralem Plattenepithelkarzinom und von 33 gesunden Personen. Der Median des Expressionslevels der mRNA der  $\beta 6$ -Untereinheit des Integrin-Dimers  $\alpha \beta 6$  lag in der Gruppe der erkrankten Personen mit 0,3174 höher als in der Gruppe der gesunden Personen mit 0,1221. Bestätigt wurde dieser Unterschied bei Betrachtung des Mittelwerts; hierbei ergab sich ein höherer Wert von 12,5195 bei den Erkrankten gegenüber 0,6664 bei den Gesunden. Im Mann-Whitney-U-Test wurde ein signifikanter Unterschied im Expressionslevel der  $\beta 6$ -mRNA zwischen beiden Gruppen mit einem p-Wert von 0,013 bestätigt. Da in der Gruppe der Personen mit einem oralem Plattenepithelkarzinom ein signifikant erhöhter Wert des Expressionslevels der  $\beta 6$ -mRNA gegenüber der Gruppe der Gesunden vorlag, lässt sich zusammenfassend festhalten, dass die mRNA der  $\beta 6$ -Untereinheit des Integrin  $\alpha \beta 6$  als Bestätigungs- und Verlaufsparemeter in der Tumordiagnostik von Personen mit einem oralem Plattenepithelkarzinom zum Einsatz kommen kann. Das heißt, dass ein erhöhter Wert der  $\beta 6$ -mRNA bei der Tumorsuche auf das Vorhandensein eines oralen Plattenepithelkarzinoms hinweisen kann. Weiterhin kann ein erhöhtes Expressionslevel der mRNA des Integrin  $\alpha \beta 6$  in einer Kontrolluntersuchung nach erfolgter Therapie eines Erstkarzinoms ein Tumorrezidiv als Ursache haben.

Um zu untersuchen, ob ein signifikanter Zusammenhang zwischen den Prognosefaktoren Tumorgröße, Differenzierungsgrad des Tumors, Nodal-Status und Beschaffenheit des Resektionsrands sowie AJCC-Stadium und dem Expressionslevel der im Blut zirkulierenden  $\beta 6$ -mRNA besteht, wurde der Spearman-Rho-Test eingesetzt. Bei den Parametern

Tumorgröße, Differenzierungsgrad des Tumors, Beschaffenheit des Resektionsrands und AJCC-Stadium wurde keine signifikante Korrelation bestätigt. Mit einem p-Wert von 0,07 wurde ein schwach signifikanter Zusammenhang zwischen der Höhe der Expression der  $\beta 6$ -mRNA und dem Nodal-Status festgestellt.

Prognostisch von großer Relevanz ist der Lymphknotenstatus; bei Vorhandensein von Lymphknotenmetastasen (N1–N3) sinkt die Überlebensrate drastisch.

Vorausgegangene Studien zeigten auf, dass die Tumordifferenzierung und das T-Stadium demgegenüber eine herabgesetzte prognostische Bedeutung aufweisen.

Entsprechend dem pathologischen Befund wird mittlerweile ein Großteil der konventionellen Plattenepithelkarzinome der Mundhöhle dem Stadium G2 mit einem mäßigen Differenzierungsgrad zugeordnet, dies spiegelte sich auch in der vorliegenden Studie wider.

Weiter grenzen sich neben gering malignen Unterformen des oralen Plattenepithelkarzinoms hochgradig maligne Varianten ab, die unabhängig von der Tumorgröße ein aggressives und schnelles Wachstumsmuster aufzeigen können.

Umso interessanter ist das Ergebnis dieser Studie, das einen schwach signifikanten Zusammenhang zwischen der Höhe der Expression der  $\beta 6$ -mRNA und dem Nodal-Status aufzeigt. In Folgestudien sollte insbesondere diesem Ergebnis ein hoher Stellenwert zugeschrieben werden und detaillierte Untersuchungen zu dargestellter Korrelation sollten durchgeführt werden.

Um an die vorliegende Pilotstudie anzuknüpfen, sollten gewonnene Ergebnisse in einem anschließenden Projekt anhand eines größeren Kollektivs überprüft werden. Dabei ist darauf zu achten, dass die unter 4.4 beschriebenen Fehlerquellen reduziert werden und in der Gruppe der gesunden sowie in der der erkrankten Personen eine ähnliche Verteilung bezüglich Alter, Geschlecht und Anzahl der Studienteilnehmenden geplant wird. Dadurch wird eine bessere Vergleichbarkeit der einzelnen Werte erreicht.

Heute eingesetzte modernste Hochdurchsatz-PCR-Verfahren können mit deutlich weniger zeitlichem Aufwand hohe Fallzahlen generieren, sodass die Thematik dieser Studie in einem größeren Kollektiv an erkrankten und gesunden Personen verifiziert werden kann.

## 6 Summary

Since tumor-specific nucleic acids were discovered in the blood of cancer patients, circulating fragments of tumor-associated genomic DNA, microRNAs and mRNA in blood samples have been used as control and progression parameters in the care of cancer patients as an option to complete the diagnostic picture.

My experimental study investigated methods for isolating and quantifying the  $\beta 6$ -mRNA. The  $\beta 6$ -mRNA encodes the  $\beta 6$  subunit of the integrin dimer  $\alpha v\beta 6$ . Since this integrin is thought to play a decisive role in tumor development, tissue invasion and metastasis, this study examined the suitability of integrin as a potential tumor marker in the diagnosis and follow-up of patients with oral squamous cell carcinoma. The study looked at whether there is a correlation between this integrin's free nucleic acids in the blood plasma of those affected and the tumor's prognostic factors.

The mRNA from the blood plasma of 55 patients with histologically confirmed oral squamous cell carcinoma and 33 healthy patients was isolated. The median of expression level of mRNA of the  $\beta 6$  subunit of the integrin dimer  $\alpha v\beta 6$  is higher in the group of diseased patients (0.3174) than in the group of healthy subjects (0.1221). This difference was even more pronounced when the mean was considered: a higher result of 12.5195 in the group of diseased patients compared to 0.6664 in the group of healthy patients. The Mann-Whitney U test confirmed a significant difference in the expression level of  $\beta 6$ -mRNA between the two groups with a p-value of 0,013.

Since the group of patients with oral squamous cell carcinoma showed a significantly higher value in the expression level of  $\beta 6$ -mRNA than the healthy group, the following conclusion can be drawn:  $\beta 6$ -mRNA of the integrin  $\alpha v\beta 6$  may end up being used as a confirmatory and progression parameter in tumor diagnostics of patients with oral squamous cell carcinoma. In other words, an elevated level of  $\beta 6$ -mRNA in tumor screening may indicate the presence of oral squamous cell carcinoma. Furthermore, tumor recurrence may be the cause of an increased expression of integrin found in a check-up following therapy. The Spearman's Rho test was used to study whether there is a significant correlation between the prognostic factors tumour size, degree of differentiation of the tumour, nodal status and nature of the resection margin and AJCC stage and the expression level of the  $\beta 6$ -mRNA circulating in the blood. No significant correlation was confirmed for the parameters tumour size, degree of differentiation of the tumour, nature of the resection margin

and AJCC stage. With a p-value of 0,07, an only slightly significant relationship was found between the level of expression of the  $\beta 6$ -mRNA and the nodal-status.

Prognostically, the lymph node status is of great relevance; in the presence of lymph node metastases (N1-N3), the survival rate decreases drastically.

Previous studies showed that the tumour differentiation and the T-stage had a reduced prognostic significance in comparison.

For example, today almost all pathologists assign a conventional squamous cell carcinoma of the oral cavity to stage G2 with a moderate degree of differentiation, which was also reflected in the present study.

Furthermore, in addition to minor malignant subforms of the oral squamous cell carcinoma, highly malignant variants are present which can show an aggressive and rapid growth pattern irrespective of the size of the tumour.

The result of this study is all the more interesting as it only shows a slightly significant relationship between the level of expression of the  $\beta 6$ -mRNA and the nodal status. In future follow-up studies, this result in particular should be given high importance and detailed studies on this correlation should be carried out.

To carry on the research and build up on the results of this pilot study it will be useful to verify results obtained in a larger patient population. When doing so, care should be taken to reduce the sources of error described in 4.4 and to plan for a similar distribution in terms of age, sex and number of test subjects (particularly in the healthy group) in order to make the values more comparable.

Today's state-of-the-art high-throughput PCR methods can generate high numbers of cases with significantly less time required to verify this study's topic in a larger group of ill and healthy test persons.

## Literaturverzeichnis

IBM (2019) IBM SPSS Statistics for Windows, Version 26.0. Armonk, NZ: IBM Corp

London: Royal College of Surgeons of England (1994) Department of Dental Services. Screening for oral cancer.

Robert-Koch-Institut (2019) Krebs in Deutschland für 2015/2016. Gemeinsame Publikationen des Zentrums für Krebsregisterdaten und der Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland E.V., 12. Ausgabe, Berlin: 24

The National Cancer Institute. Cancer Therapy Evaluation Programme. [cited 11 August 2006]. Available from url: <http://ctep.info.nih.gov>

Saarbrücken (2006) Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (GEKID) in Zusammenarbeit mit dem Robert Koch Institut: 5. überarbeitet, aktualisierte Ausgabe

Statistisches Bundesamt (Destatis) (2022) Staat und Gesellschaft-Todesursachen-Gestorbene nach ausgewählten Todesursachen. Abgerufen am 05. Oktober 2022

Adams S, Baum RP, Stuckensen T, Bitter K, Hör G (1998) Prospective comparison of 18F-FDG PET with conventional imaging modalities (CT, MRI, US) in lymph node staging of head and neck cancer. *Eur J Nucl Med* 25(9): 1255-1260

Agra IM, Carvalho AL, Pontes E, Campos OD, Ulbrich FS, Magrin J, Kowalski LP (2003) Postoperative complications after en bloc salvage surgery for head and neck cancer. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 129(12): 1317-1321

Agrez MV (1996) Cell adhesion molecules and colon cancer. *Aust N Z J Surg* 66(12): 791-798

Akhtar S, Ikram M, Ghaffar S (2007) Neck involvement in early carcinoma of tongue. Is elective neck dissection warranted? *J Pak Med Assoc* 57(6): 305-307

Akhter M, Hossain S, Rahman QB, Molla MR (2011) A study on histological grading of oral squamous cell carcinoma and its co-relationship with regional metastasis. *J Oral Maxillofac Pathol* 15(2): 168-176

Andrle J, Schartinger VH, Schwentner I, Deibl M, Sprinzl GM (2009) Initial staging examinations for head and neck squamous cell carcinoma: are they appropriate? *J Laryngol Otol* 123(8): 885-888

Ang KK, Trotti A, Brown BW, Garden AS, Foote RL, Morrison WH, Geara FB, Klotch DW, Goepfert H, Peters LJ (2001) Randomized trial addressing risk features and time factors of surgery plus radiotherapy in advanced head-and-neck cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 51(3): 571-578

- Arezi B, Xing W, Sorge JA, Hogrefe HH (2003) Amplification efficiency of thermostable DNA polymerase. *Anal Biochem* 321(2): 226-235
- Arihiro K, Kaneko M, Fujii S, Inai K, Yokosaki Y (2000) Significance of alpha 9 beta 1 and alpha v beta 6 integrin expression in breast carcinoma. *Breast Cancer* 7(1): 19-26
- Aro K, Wie F, Wong DT, Tu M (2017) Saliva liquid biopsy for point-of-care applications. *Front Public Heal* 5: 77
- Ashworth TR (1869) A case of cancer in which cells similar to those in the tumors were seen in the blood after death. *Aust Med J* 14: 146-147
- Awwad HK, Lotayef M, Shouman T, Begg AC, Wilson G, Bentzen SM, Abd El-Moneim H, Eissa S (2002) Accelerated hyperfractionation (AHF) compared to conventional fractionation (CF) in the postoperative radiotherapy of locally advanced head and neck cancer: influence of proliferation. *Br J Cancer* 86(4): 517-523
- Axéll T (2001) Hypersensitivity of the oral mucosa: clinics and pathology. *Acta Odontol Scand* 59(5): 315-319
- Bachaud JM, Cohen-Jonathan E, Alzieu C, David JM, Serrano E, Daly-Schweitzer N (1996) Combined postoperative radiotherapy and weekly cisplatin infusion for locally advanced head and neck carcinoma: final report of a randomized trial. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 36(5): 999-1004
- Bacich DJ, Sobek KM, Cummings JL, Atwood AA, O'Keefe DS (2011) False negative results from using common PCR reagents. *BMC Res Notes* 4: 457
- Bagnardi V, Blangiardo M, La Vecchia C, Corrao G (2001) Alcohol consumption and the risk of cancer: a meta-analysis. *Alcohol Res Health* 25(4): 263-270
- Bailey JS, Blanchaert RH, Ord RA (2001) Management of oral squamous cell carcinoma treated with inadequate excisional biopsy. *J Oral Maxillofac Surg* 59(9): 1007-1010
- Bandyopadhyay A, Raghavan S (2009) Defining the role of integrin alphavbeta6 in cancer. *Curr Drug Targets* 10(7): 645-652
- Bates RC, Bellovin DI, Brown C, Maynard E, Wu Bingyan, Kawakatsu H, Sheppard D, Oettgen P, Mercurio AM (2005) Transcriptional activation of integrin beta6 during the epithelial-mesenchymal transition defines a novel prognostic indicator of aggressive colon carcinoma. *J Clin Invest* 115(2): 339-347

- Bernier J, Domenge C, Ozsahin M, Matuszewska K, Lefèbvre JL, Greiner RH, Giralt J, Maingon P, Rolland F, Bolla M, Cognetti F, Bourhis J, Kirkpatrick A, van Glabbeke M (2004) Postoperative irradiation with or without concomitant chemotherapy for locally advanced head and neck cancer. *N Engl J Med* 350(19): 1945-1952
- Bernier J, Cooper JS, Pajak TF, van Glabbeke M, Bourhis J, Forastiere A, Ozsahin EM, Jacobs JR, Jassem J, Ang KK, Lefèbvre JL (2005) Defining risk levels in locally advanced head and neck cancers: a comparative analysis of concurrent postoperative radiation plus chemotherapy trials of the EORTC (#22931) and RTOG (# 9501). *Head Neck* 27(10): 843-850
- Bernier J (2007) Adjuvant treatment of head and neck cancers: advances and challenges. *Bull Cancer* 94(9): 823-827
- Bhowmick NA, Ghiassi M, Bakin A, Aakre M, Lundquist CA, Engel ME, Arteaga CL, Moses HL (2001a) Transforming growth factor-beta 1 mediates epithelial to mesenchymal transdifferentiation through a RhoA-dependent mechanism. *Mol Biol Cell* 12(1): 27-36
- Bhowmick NA, Zent R, Ghiassi M, McDonnell M, Moses HL (2001b) Integrin beta 1 signaling is necessary for transforming growth factor-beta activation of p38MAPK and epithelial plasticity. *J Biol Chem* 276(50): 46707-46713
- Blanco MJ, Moreno-Bueno G, Sarrio D, Locascio A, Cano A, Palacios J, Nieto MA (2002) Correlation of Snail expression with histological grade and lymph node status in breast carcinomas. *Oncogene* 21(20): 3241-3246
- Bolzoni A, Cappiello J, Piazza C, Peretti G, Maroldi R, Farina D, Nicolai P (2004) Diagnostic accuracy of magnetic resonance imaging in the assessment of mandibular involvement in oral-oropharyngeal squamous cell carcinoma: a prospective study. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 130(7): 837-843
- Bonner JA, Harari PM, Giralt J, Azarnia N, Shin DM, Cohen RB, et al. (2006) Radiotherapy plus cetuximab for squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med* 354(6): 567-578
- Bootz F, Howaldt HP, Mergenthaler HG, Wendt T (2008) Karzinome des oberen Aerodigestivtraktes. In: "Kurzgefasste interdisziplinäre Leitlinien", Garbe, C. (Hrsg.) Deutsche Krebsgesellschaft e.V. W. Zuckschwerdt, München, Wien, New York
- Bosetti C, Talamini R, Levi F, Negri E, Franceschi S, Airoldi L, La Vecchia C (2002) Fried Foods: a risk factor for laryngeal cancer? *Br J Cancer* 87(11): 1230-1233



- Bosetti C, Gallus S, Trichopoulou A, Talamini R, Franceschi S, Negri E, La Vecchia C (2003) Influence of the Mediterranean diet on the risk of cancers of the upper aerodigestive tract. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 12(10): 1091-1094
- Bourhis J, Overgaard J, Audry H, Ang KK, Saunders M, Bernier J, et al. (2006) Hyperfractionated or accelerated radiotherapy in head and neck cancer: a meta-analysis. *Lancet* 368(9538): 843-854
- Brabletz T, Hlubek F, Spaderna S, Schmalhofer O, Hiendlmeyer E, Jung A, Kirchner T (2005) Invasion and metastasis in colorectal cancer: epithelial-mesenchymal transition, mesenchymal-epithelial transition, stem cells and beta-catenin. *Cells Tissues Organs* 179(1-2): 56-65
- Breuss JM, Gallo J, DeLisser HM, Klimanskaya IV, Folkesson HG, Pittet JF, Nishimura SL, Aldape K, Landers DV, Carpenter W (1995) Expression of the beta 6 integrin subunit in development, neoplasia and tissue repair suggests a role in epithelial remodeling. *J Cell Sci* 108(6): 2241-2251
- Brown JS, Kalavrezos N, D'Souza J, Lowe D, Magennis P, Woolgar JA (2002) Factors that influence the method of mandibular resection in the management of oral squamous cell carcinoma. *Br J Oral Maxillofac Surg* 40(4): 275-284
- Bustin SA (2002) Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *J Mol Endocrinol* 29(1): 23-39
- Byers RM, Wolf PF, Ballantyne AJ (1988) Rationale for elective modified neck dissection. *Head Neck Surg* 10(3): 160-167
- Byers RM, Weber RS, Andrews T, McGill D, Kare R, Wolf P (1997) Frequency and therapeutic implications of "skip metastases" in the neck from squamous carcinoma of the oral tongue. *Head Neck* 19(1): 14-19
- Byers RM, El-Naggar AK, Lee YY, Rao B, Fornage B, Terry NH, Sample D, Hankins P, Smith TL, Wolf PJ (1998) Can we detect or predict the presence of occult nodal metastases in patients with squamous carcinoma of the oral tongue? *Head Neck* 20(2): 138-144
- Calais G, Alfonsi M, Bardet E, Sire C, Germain T, Bergerot P, Rhein B, Tortochaux J, Oudinot P, Bertrand P (1999) Randomized trial of radiation therapy versus concomitant chemotherapy and radiation therapy for advanced- stage oropharynx carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 91(24): 2081-2086
- Campbell N, Reece J (2003) *Biologie*. Spektrum-Verlag. 1208
- Carinci F, Pelucchi S, Farina A, De Franciscis G, Calcaro C (1998) Extension as a prognostic factor in oropharyngeal cancer: largest mucosal dimension compared with number of (sub)sites involved. *Br J Oral Maxillofac Surg* 36(6): 440-445

- Carmeliet P, Jain RK (2000) Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* 407(6801): 249-257
- Chao KS, Deasy JO, Markman J, Haynie J, Perez CA, Purdy JA, Low DA (2001) A prospective study of salivary function sparing in patients with head-and-neck cancers receiving intensity-modulated or three-dimensional radiation therapy: initial results. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 49(4): 907-916
- Cheng L, Sturgis EM, Eicher SA, Spitz MR, Wei Q (2002) Expression of nucleotide excision repair genes and the risk for squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer* 94(2): 393-397
- Chiarini L, De Santis G, Bedogni A, Nocini PF (2002) Lining the mouth floor with prelaminate fascio-mucosal free flaps: clinical experience. *Microsurgery* 22(5): 177-186
- Chow TL, Lee DT, Choi CY, Chan TT, Lam SH (2009) Prediction of simultaneous esophageal lesions in head and neck squamous cell carcinoma: a multivariate analysis. *Arch of Otolaryngol Head Neck Surg* 135(9): 882-885
- Christofanilli M, Budd GT, Ellis MJ, Stopeck A, Matera J, Miller MC, Reuben JM, Doyle GV, Allard WJ, Terstappen LW, Hayes DF (2004) Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer. *N Engl J Med* 351(8): 781-791
- 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(3): 258-261
- Cole I, Hughes L (1997) The relationship of cervical lymph node metastases to primary sites of carcinoma of the upper aerodigestive tract: a pathological study. *Aust N Z J Surg* 67(12): 860-865
- Corlette TH, Cole IE, Albsoul N, Ayyash M (2005) Neck dissection of level IIb: is it really necessary? *Laryngoscope* 115(9): 1624-1626
- Cox JD, Stetz J, Pajak TF (1995) Toxicity criteria of the Radiation Therapy Oncology Group (RTOG) and the European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC). *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 31(5): 1341-1346
- Crean SJ, Hoffman A, Potts J, Fardy MJ (2003) Reduction of occult metastatic disease by extension of the supraomohyoid neck dissection to include level IV. *Head Neck* 25(9): 758-762
- Critchley DR (2000) Focal adhesions - the cytoskeletal connection. *Curr Opin Cell Biol* 12(1): 133-139

- Critchley JA, Unal B (2003) Health effects associated with smokeless tobacco: a systematic review. *Thorax* 58(5): 435-443
- Cruz GD, Le Geros RZ, Ostroff JS, Hay JL, Kenigsberg H, Franklin DM (2002) Oral cancer knowledge, risk factors and characteristics of subjects in a large oral cancer screening program. *J Am Dent Assoc* 133(8): 1064-1071
- Dahlstrom KR, Adler-Storthz K, Etzel CJ, Liu Z, Dillon L, El-Naggar AK, Spitz MR, Schiller JT, Wei Q, Sturgis EM (2003) Human papillomavirus type 16 infection and squamous cell carcinoma of the head and neck in never- smokers: a matched pair analysis. *Clin Cancer Res* 9(7): 2620-2626
- Day GL, Blot WJ (1992) Second primary tumors in patients with oral cancer. *Cancer* 70(1): 14-19
- Day TA, Davis BK, Gillespie MB, Joe JK, Kibbey M, Martin-Harris B, Neville B, Reed SG, Richardson MS, Rosenzweig S, Sharma AK, Smith MM, Stewart S, Stuart RK (2003) Oral cancer treatment. *Curr Treat Options Oncol* 4(1): 27-41
- De Bree R, Deurloo EE, Snow GB, Leemans CR (2000) Screening for distant metastases in patients with head and neck cancer. *Laryngoscope* 110(3 Pt 1): 397-401
- De Vries N, van der Waal I, Snow GB (1986) Multiple primary tumours in oral cancer. *Int J Oral Maxillofac Surg* 15(1): 85-87
- Denis F, Garaud P, Bardet E, Alfonsi M, Sire C, Germain T, Bergerot P, Rhein B, Tortochaux J, Oudinot P, Calais G (2003) Late toxicity results of the GORTEC 94-01 randomized trial comparing radiotherapy with concomitant radiochemotherapy for advanced-stage oropharynx carcinoma: comparison of LENT/SOMA, RTOG/EORTC, and NCI-CTC scoring systems. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 55(1): 93-98
- Derynck R, Akhurst RJ, Balmain A (2001) TGF-beta signaling in tumor suppression and cancer progression. *Nat Genet* 29(2): 117-129
- Desitter I, Guerrouahen BS, Benali-Furet N, Wechsler J, Jänne PA, Kuang Y, Yanagita M, Wang L, Berkowitz JA, Distel RJ, Cayre YE (2011) A new device for rapid isolation by size and characterization of rare circulating tumor cells. *Anticancer Res* 31(2): 427-441
- Diajil A, Robinson CM, Sloan P, Thomson PJ (2013) Clinical outcome following oral potentially malignant disorder treatment: a 100 patient cohort study. *Int J Dent*: 809248
- Dias FL, Kligerman J, Matos de Sa G, Arcuri RA, Freitas EQ, Farias T, Matos F, Lima RA (2001) Elective neck dissection versus observation in stage I squamous cell carcinomas of the tongue and floor of the mouth. *Otolaryngol Head Neck Surg* 125(1): 23-29

- Di Meo A, Bartlett J, Cheng Y, Pasic MD, Yousef GM (2017) Liquid biopsy: a step forward towards precision medicine in urologic malignancies. *Mol Cancer* 16(1): 80
- Dionne KR, Warnakulasuriya S, Zain RB, Cheong SC (2015) Potentially malignant disorders of the oral cavity: current practice and future directions in the clinic and laboratory. *Int J Cancer* 136(3): 503-515
- Doroshov JH, Parchment RE (2008) Oncologic phase 0 trials incorporating clinical pharmacodynamics: from concept to patient. *Clin Cancer Res* 14(12): 3658-3663
- Dos Santos CR, Goncalves Filho J, Magrin J, Johnson LF, Ferlito A, Kowalski LP (2001) Involvement of level I neck lymph nodes in advanced squamous carcinoma of the larynx. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 110(10): 982-984
- Dotan E, Cohen SJ, Alpaugh KR, Meropol NJ (2009) Circulating tumor cells: evolving evidence and future challenges. *Oncologist* 14(11): 1070-1082
- Eckey H (2006) Kleine Abhandlungen - Statistische Signifikanz (p-Wert). *Wirtschaftswissenschaftliches Studium* 35(7): 415-418
- Elahi A, Zheng Z, Park J, Eyring K, McCaffrey T, Lazarus P (2002) The human OGG1 DNA repair enzyme and its association with orolaryngeal cancer risk. *Carcinogenesis* 23(7): 1229-1234
- Elahi A, Bendaly J, Zheng Z, Muscat JE; Richie JP Jr, Schantz SP, Lazarus P (2003) Detection of UGT1A10 polymorphisms and their association with orolaryngeal carcinoma risk. *Cancer* 98(4): 872-880
- El-Hefnawy T, Raja S, Kelly L, Bigbee WL, Kirkwood JM, Luketich JD, Godfrey TE (2004) Characterization of amplifiable, circulating RNA in plasma and its potential as a tool for cancer diagnostics. *Clin Chem* 50(3): 564-573
- El-Husseiny G, Kandil A, Jamshed A, Khafaga Y, Saleem M, Allam A, Al-Rajhi N, Al-Amro A, Rostom AY, Abuzeid M, Otieschan A, Flores AD (2000) Squamous cell carcinoma of the oral tongue: an analysis of prognostic factors. *Br J Oral Maxillofac Surg* 38(3): 193-199
- El-Sayed S, Nelson N (1996) Adjuvant and adjunctive chemotherapy in the management of squamous cell carcinoma of the head and neck region. A meta-analysis of prospective and randomized trials. *J Clin Oncol* 14(3): 838-847
- Elsheikh MN, Mahfouz ME, Elsheikh E (2005) Level IIb lymph nodes metastasis in elective supraomohyoid neck dissection for oral cavity squamous cell carcinoma: a molecular-based study. *Laryngoscope* 115(9): 1636-1640
- Enders G (2020) Labor Prof. Dr. G. Enders MVZ GbR. Medizinische Diagnostik. <http://www.labor-enders.de/index.php?id=4> aufgerufen am 28.01.2020

- Epstein JB, Lunn R, Le N, Stevenson-Moore P (1998) Periodontal attachment loss in patients after head and neck radiation therapy. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 86(6): 673-677
- Faber KL, Person EC, Hudlow WR (2013) PCR inhibitor removal using the NucleoSpin® DNA Clean-Up XS kit. *Forensic Sci Int Genet* 7(1): 209–213
- Fahrmeir L, Heumann C, Künstler R, Pigeot I, Tutz G (2016) Statistik- Der Weg zur Datenanalyse. Heidelberg: Springer-Verlag: 128
- Fakih AR, Rao RS, Borges AM, Patel AR (1989) Elective versus therapeutic neck dissection in early carcinoma of the oral tongue. *Am J Surg* 158(4): 309-313
- Farrell R (2009) RNA Methodologies. Elsevier Ltd, Oxford; Auflage: 4<sup>th</sup>
- Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray F (2015) Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer* 136(5): 359-386
- Ferlito A, Rinaldo A, Devaney KO, Nakashiro K, Hamakawa H (2008) Detection of lymph node micrometastases in patients with squamous carcinoma of the head and neck. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 265(10): 1147-1153
- Ferlito A, Silver CE, Rinaldo A (2009). Elective management of the neck in oral cavity squamous carcinoma: current concepts supported by prospective studies. *Br J Oral Maxillofac Surg* 47(1): 5-9
- Fielding D, Agnew J, Wright D, Hodge R (2010) Autofluorescence improves pretreatment mucosal assessment in head and neck cancer patients. *Otolaryngol Head Neck Surgery* 142(3Suppl1): 20-26
- Filipits M, Rudas M, Jakesz R, Dubsky P, Fitzal F, Singer CF, Dietze O, Greil R et al. (2011) A new molecular predictor of distant recurrence in ER-positive, HER2-negative breast cancer adds independent information to conventional clinical risk factors. *Clin Cancer Res* 17(18): 6012-6020
- Folkman J (2002) Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis. *Semin Oncol* 29(6 Suppl 16): 15-18
- Fortin A, Couture C, Doucet R, Albert M, Allard J, Tetu B (2001) Does histologic grade have a role in the management of head and neck cancers? *J Clin Oncol* 19(21): 4107-4116
- Fountzilas G, Ciuleanu E, Dafni U, Plataniotis G, Kalogera-Fountzila A, Samantas E, Athanassiou E, Tzitzikas J, Ciuleanu T, Nikolaou A, Pantelakos P, Zaraboukas T, Zamboglou N, Daniilidis J, Ghilezan N (2004) Concomitant radiochemotherapy vs radiotherapy alone in patients with head and neck cancer: a Hellenic Cooperative Oncology Group Phase III Study. *Med Oncol* 21(2): 95-107

- Frisch SM, Francis H (1994) Disruption of epithelial cell-matrix interactions induces apoptosis. *J Cell Biol* 124(4): 619-626
- Fuller C, Camilon R, Nguyen S, Jennings J, Day T, Gillespie MB (2015) Adjunctive diagnostic techniques for oral lesions of unknown malignant potential: systematic review with meta-analysis. *Head Neck* 37(5): 755-762
- García-Olmo D, García-Olmo DC, Ontañón J, Martínez E (2000) Horizontal transfer of DNA and the “genometastasis hypothesis”. *Blood* 95(2): 724-725
- Garden AS, Harris J, Vokes EE, Forastiere AA, Ridge JA, Jones C, Horwitz EM, Glisson BS, Nabell L, Cooper JS, Demas W, Gore E (2004) Preliminary results of Radiation Therapy Oncology Group 97-03: a randomized phase ii trial of concurrent radiation and chemotherapy for advanced squamous cell carcinomas of the head and neck. *J Clin Oncol* 22(14): 2856-2864
- Gerber S, Gengler C, Grätz KW, Kruse AL (2011) The impact of frozen sections on final surgical margins in squamous cell carcinoma of the oral cavity and lips: a retrospective analysis over an 11 years period. *Head Neck Oncol* 3: 56
- Gilbey AM, Burnett D, Coleman RE, Holen I (2004) The detection of circulating breast cancer cells in blood. *J Clin Pathol* 57(9): 903-911
- Girardi FM, Zanella VG, Kroef RG (2013) Correlation between clinical and pathological data and surgical margins in patients with squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Braz J Otorhinolaryngol* 79(2): 190-195
- Glenny AM, Furness S, Worthington HV, Conway DI, Oliver R, Clarkson JE, Macluskey M, Pavitt S, Chan KK, Brocklehurst P (2010) Interventions for the treatment of oral cavity and oropharyngeal cancer: radiotherapy. *Cochrane Database Syst Rev* 12: CD006387
- Goerres GW, Schmid DT, Schuknecht B, Eyrich GK (2005) Bone invasion in patients with oral cavity cancer: comparison of conventional CT with PET/CT and SPECT/CT. *Radiology* 237(1): 281-287
- Goodwin WJ Jr (2000) Salvage surgery for patients with recurrent squamous cell carcinoma of the upper aerodigestive tract: when do the ends justify the means? *Laryngoscope* 110(3 Pt 2 Suppl 93): 1-18
- Gorges TM, Pantel K (2013) Circulating tumor cells as therapy-related biomarkers in cancer patients. *Cancer Immunol Immunother* 62(5): 931-939
- Greenberg JS, Fowler R, Gomez J, Mo V, Roberts D, El Naggar AK, Myers JN (2003) Extent of extracapsular spread: a critical prognosticator in oral tongue cancer. *Cancer* 97(6): 1464-1470

- Gregor RT (2000) Management of chyle fistulization in association with neck dissection. *Otolaryngol Head Neck Surg* 122(4): 434-439
- Gröbe A, Blessmann M, Hanken H, Friedrich RE, Schön G, Wikner J, Effenberger KE, Kluwe L, Heiland M, Pantel K, Riethdorf S, (2014) Prognostic relevance of circulating tumor cells in blood and disseminated tumor cells in bone marrow of patients with squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Clin Cancer Res* 20(2): 425-433
- Grünert S, Jechlinger M, Beug H (2003) Diverse cellular and molecular mechanisms contribute to epithelial plasticity and metastasis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4(8): 657-665
- Gu DH, Yoon DY, Park CH, Chang SK, Lim KJ, Seo YL, Yun EJ, Choi CS, Bae SH (2010) CT, MR, (18)F-FDG PET/CT, and their combined use for the assessment of mandibular invasion by squamous cell carcinomas of the oral cavity. *Acta Radiol* 51(10): 1111-1119
- Guerra MF, Gias LN, Campo FJ, Pérez JS (2003) Marginal and segmental mandibulectomy in patients with oral cancer: a statistical analysis of 106 cases. *J Oral Maxillofac Surg* 61(11): 1289-1296
- Gupta PB, Mani S, Yang J, Hartwell K, Weinberg RA (2005) The evolving portrait of cancer metastasis. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 70: 291-297
- Haddad RI, Shin DM (2008) Recent advances in head and neck cancer. *N Engl J Med* 359(11): 1143-1154
- Hanahan D, Weinberg RA (2000) The hallmarks of cancer. *Cell* 100(1): 57-70
- Hao SP, Tsang NM (2002) The role of supraomohyoid neck dissection in patients of oral cavity carcinoma. *Oral Oncol* 38(3): 309-312
- Haraf DJ, Weichselbaum RR, Vokes EE (1996) Re-irradiation with concomitant chemotherapy of unresectable recurrent head and neck cancer: a potentially curable disease. *Ann Oncol* 7(9): 913-918.
- Harris LN, Ismaila N, McShane LM, Andre F, Collyar DE, Conzalez-Angulo AM, Hammond EH, Kuderer NM, Liu MC, Mennel RG, Van Poznak C, Bast RC, Hayes DF (2016) Use of Biomarkers to Guide Decisions on Adjuvant Systemic Therapy for Women with Early-Stage Invasive Breast Cancer: American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline. *J Clin Oncol* 34(10): 1134-1150
- Hartwell KA, Muir B, Reinhardt F, Carpenter AE, Sgroi DC, Weinberg RA (2006) The Spemann organizer gene, Goosecoid, promotes tumor metastasis. *Proc Natl Acad Sci USA* 103(50): 18969-18974

- Hayden RE, Deschler DG (1999) Lateral thigh free flap for head and neck reconstruction. *Laryngoscope* 109(9): 1490-1494
- Hazelbag S, Kenter GG, Gorter A, Dreef EJ, Koopman LA, Violette SM, Weinreb PH, Fleuren GJ (2007) Overexpression of the alpha v beta 6 integrin in cervical squamous cell carcinoma is a prognostic factor for decreased survival. *J Pathol* 212(3): 316-324
- Hedderich J, Sachs L (2018) *Angewandte Statistik*. Berlin: Springer Verlag: 533
- Henick DH, Silver CE, Heller KS, Shaha AR, El GH, Wolk DP (1995) Supraomohyoid neck dissection as a staging procedure for squamous cell carcinomas of the oral cavity and oropharynx. *Head Neck* 17(2): 119-123
- Henk JM, Bishop K, Shepherd SF (2003) Treatment of head and neck cancer with CHART and nimorazole: phase II study. *Radiother Oncol* 66(1): 65-70
- Herrero R, Castellsagué X, Pawlita M, Lissowska J, Kee F, Balaram P, Rajkumar T, Sridhar H, Rose B, Pintos J, Fernández L, Idris A, Sánchez MJ, Nieto A, Talamini R, Tavani A, Bosch FX, Reidel U, Snijders PJ, Meijer CJ, Viscidi R, Muñoz N, Franceschi S, IARC Multicenter Oral Cancer Study Group (2003) Human papillomavirus and oral cancer: the International Agency for Research on Cancer multicenter study. *J Natl Cancer Inst* 95(23): 1772-1783
- Hinerman RW, Mendenhall WM, Morris CG, Amdur RJ, Werning JW, Villaret DB (2004) Postoperative irradiation for squamous cell carcinoma of the oral cavity: 35-year experience. *Head Neck* 26(11): 984-994
- Ho CM, Lam KH, Wei WI, Lau WF (1992) Treatment of neck nodes in oral cancer. *Surg Oncol* 1(1): 73-78
- Hollows P, McAndrew PG, Perini MG (2000) Delays in the referral and treatment of oral squamous cell carcinoma. *Br Dent J* 188(5): 262-265
- Hou JM, Krebs M, Ward T, Sloane R, Priest L, Hughes A, Clack G, Ranson M, Blackhall F, Dive C (2011) Circulating tumor cells as a window on metastasis biology in lung cancer. *Am J Pathol* 178(3): 989-996
- Huang DT, Johnson CR, Schmidt-Ullrich R, Grimes M (1992) Postoperative radiotherapy in head and neck carcinoma with extracapsular lymph node extension and/or positive resection margins: a comparative study. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 23(4): 737-742
- Hübbers CU, Akgül B (2015) HPV and cancer of the oral cavity. *Virulence* 6(3): 244-248



- Huber GF, Züllig L, Soltermann A, Roessle M, Graf N, Haerle SK, Studer G, Jochum W, Moch H, Stoeckli SJ (2011) Down regulation of E-Cadherin (ECAD) - a predictor for occult metastatic disease in sentinel node biopsy of early squamous cell carcinomas of the oral cavity and oropharynx. *BMC Cancer* 11(217): 1-8
- Humphris GM, Ireland RS, Field EA (2001a) Immediate knowledge increase from an oral cancer information leaflet in patients attending a primary health care facility: a randomised controlled trial. *Oral Oncol* 37(1): 99-102
- Humphris GM, Ireland RS, Field EA (2001b) Randomised trial of the psychological effect of information about oral cancer in primary care settings. *Oral Oncol* 37(7): 548-552
- Iakovlev VV, Goswami RS, Vecchiarelli J, Arneson NC, Done SJ (2008) Quantitative detection of circulating epithelial cells by Q-RT-PCR. *Breast Cancer Res Treat* 107(1): 145-154
- Inoue H, Nibu KI, Saito M, Otsuki N, Ishida H, Onitsuka T, Fujii T, Kawabata K, Saikawa M (2006) Quality of life after neck dissection. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 132(6): 662-666
- Isayeva T, Li Y, Maswahu D, Brandwein-Gensler M (2012) Human papillomavirus in non-oropharyngeal head and neck cancers: a systematic literature review. *Head Neck Pathol* 6(1): 104-120
- Iyer SG, Pradhan SA, Pai PS, Patil S (2004) Surgical treatment outcomes of localized squamous carcinoma of buccal mucosa. *Head Neck* 26(10): 897-902
- Iype EM, Sebastian P, Mathew A, Balagopal PG, Varghese BT, Thomas S (2008) The role of selective neck dissection (I-III) in the treatment of node negative (N0) neck in oral cancer. *Oral Oncol* 44(12): 1134-1138
- Jacobsen PB, Donovan KA, Vadaparampil ST, Small BJ (2007) Systematic review and meta-analysis of psychological and activity-based interventions for cancer-related fatigue. *Health Psychol* 26(6): 660-667
- Jansohn M, Rothhämel S (2012) Gentechnische Methoden. Eine Sammlung von Arbeitsanleitungen für das molekularbiologische Labor. Spektrum Akademischer Verlag, Auflage 5. 153-167
- Jayachandran S, Sachdeva SK (2012) Diagnostic accuracy of color doppler ultrasonography in evaluation of cervical lymph nodes in oral cancer patients. *Indian J Dent Res* 23(4): 557-558
- Jelić S, Stamatović L, Vucićević S, Petrović Z, Kreacić M, Babović N, Jovanović N, Mikić A, Gavrilović D (2002) Use of high-dose cytarabine to enhance cisplatin cytotoxicity- effects on the response and overall survival rates of advanced head and neck cancer patients. *Eur J Cancer* 38(11): 1478-1489

- Jin WL, Ye WM, Zheng JW, Zhou L, Zhu HG, Zhang ZY, Tian J (2008) Occult cervical lymph node metastases in 100 consecutive patients with cN0 tongue cancer. *Chin Med J* 121(19): 1871-1874
- Johansen LV, Grau C, Overgaard J (2000) Hypopharyngeal squamous cell carcinoma-treatment results in 138 consecutively admitted patients. *Acta Oncol* 39(4): 529-536
- Jones J, Watt FM, Speight PM (1997) Changes in the expression of alpha v integrins in oral squamous cell carcinomas. *J Oral Pathol Med* 26(2): 63-68
- Jones TM, Hargrove O, Lancaster J, Fenton J, Shenoy A, Roland NJ (2002) Waiting times during the management of head and neck tumours. *J Laryngol Otol* 116(4): 275-279
- Jones HB, Sykes A, Bayman N, Sloan P, Swindell R, Patel M, Musgrove B (2009) The impact of lymphovascular invasion on survival in oral carcinoma. *Oral Oncol* 45(1): 10-15
- Joo YH, Yoo IeR, Cho KJ, Park JO, Nam IC, Kim MS (2013) Standardized uptake value and resection margin involvement predict outcomes in pN0 head and neck cancer. *Otolaryngol Head Neck Surg* 149(5): 721-726
- Kaatsch P, Spix C, Hentschel S, Katalinic A, Luttmann S, Stegmaier C (2013) Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (GEKID) in Zusammenarbeit mit dem Robert Koch Institut. Krebs in Deutschland 2009/2010. 9.Auflage. Berlin
- Kaanders JH, Hordijk GJ (2002) Carcinoma of the larynx: the Dutch national guideline for diagnostics, treatment, supportive care and rehabilitation. *Radiother Oncol* 63(3): 299- 307
- Kaczor-Urbanowicz KE, Carreras-Presas CM, Aro K, Tu M, Garcia-Godoy F, Wong DT (2017) Saliva diagnostics – current views and directions. *Exp Biol Med* 242(5): 459-472
- Kademani D (2007) Oral cancer. *Mayo Clin Proc* 82(7): 878-887
- Kalluri R, Weinberg RA (2009) The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest* 119(6): 1420-1428
- Kan Z, Jaiswal BS, Stinson J, Janakiraman V, Bhatt D, Stern HM, Yue P, Haverty PM, Bourgon R, Zheng J, Moorhead M et al. (2010) Diverse somatic mutation patterns and pathway alterations in human cancers. *Nature* 466(7308): 869-873
- Keski-Säntti H, Atula T, Törnwall J, Koivunen P, Mäkitie A (2006) Elective neck treatment versus observation in patients with T1/ T2 N0 squamous cell carcinoma of oral tongue. *Oral Oncol* 42(1): 96-101

- Keski-Säntti H, Atula T, Tikka J, Hollmén J, Mäkitie AA, Leivo I (2007) Predictive value of histopathologic parameters in early squamous cell carcinoma of oral tongue. *Oral Oncol* 43(10): 1007-1013
- Keski-Säntti H, Kontio R, Törnwall J, Leivo I, Mätzke S, Suominen S, Leppänen E, Atula T (2008) Sentinel lymph node biopsy or elective neck dissection for patients with oral squamous cell carcinoma? *Eur Arch Otorhinolaryngol* 265(1): 13-17
- Kessler P, Grabenbauer G, Leher A, Bloch-Birkholz A, Vairaktaris E, Neukam FW, Sauer R (2007) Five year survival of patients with primary oral squamous cell carcinoma. Comparison of two treatment protocols in a prospective study. *Strahlenther Onkol* 183(4): 184-189
- Kesting MR, Robitzky L, Al-Benna S, Steinstraesser L, Baurecht H, Wolff KD, Hölzle F, Nieberler M, Mücke T, Loeffelbein DJ (2009a) Bronchoscopy screening in primary oral squamous cell carcinoma: a 10-year experience. *Br J Oral Maxillofac Surg* 47(4): 279- 283
- Kesting MR, Schurr C, Robitzky L, Steinstraesser L, Nieberler M, Baurecht H, Wolff KD, Loeffelbein DJ, Mücke T (2009b) Results of esophagogastroduodenoscopy in patients with oral squamous cell carcinoma- value of endoscopic screening: 10-year experience. *J Oral Maxillofac Surg* 67(8): 1649-1655
- Kim K, Lu Z, Hay ED (2002) Direct evidence for a role of beta-catenin/ LEF-1 signaling pathway in induction of EMT. *Cell Biol Int* 26(5): 463-476
- Kligerman J, Lima RA, Soares JR, Prado L, Dias FL, Freitas EQ, Olivatto LO (1994) Supraomohyoid neck dissection in the treatment of T1/ T2 squamous cell carcinoma of oral cavity. *Am J Surg* 168(5): 391-394
- Kohler HF, da Cunha IW, Kowalski LP (2010) Impact of modified radical neck dissections on the number of retrieved nodes, recurrence and survival. *Braz J Otorhinolaryngol* 76(3): 374-377
- Kokudo T, Suzuki Y, Yoshimatsu Y, Yamazaki T, Watabe T, Miyazono K (2008) Snail is required for TGFbeta-induced endothelial-mesenchymal transition of embryonic stem cell-derived endothelial cells. *J Cell Sci* 121(20): 3317-3324
- Koontongkaew S (2013) The tumor microenvironment contribution to development, growth, invasion and metastasis of head and neck squamous cell carcinomas. *J Cancer* 4(1): 66-83
- Kovács AF (2004) Relevance of positive margins in case of adjuvant therapy of oral cancer. *Int J Oral Maxillofac Surg* 33(5): 447-453
- Kramer FJ, Janssen M, Eckardt A (2004) Second primary tumours in oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Clin Oral Investig* 8(2): 56-62

- Krebs MG, Hou JM, Ward TH, Blackhall FH, Dive C (2010) Circulating tumour cells: their utility in cancer management and predicting outcomes. *Ther Adv Med Oncol* 2(6): 351-365
- Kruse AL, Bredell M, Grätz KW (2011) Oral cancer in men and women: are there differences? *Oral Maxillofac Surg* 15(1): 51-55
- Kuhlmann J, Wensing G (2006) The applications of biomarkers in early clinical drug development to improve decision-making processes. *Curr Clin Pharmacol* 1(2): 185-191
- Kujan O, Glenny AM, Oliver RJ, Thakker N, Sloan P (2006) Screening programmes for the early detection and prevention of oral cancer. *Cochrane Database Syst Rev* 19(3): CD004150
- Lang S, Wollenberg B, Dellian M, Steuer-Vogt MK, Schwenzer K, Sautier W, Chucholowski M, Eckel R, Faas I, Wilmes E, Ehrenfeld M, Arnold W, Kastenbauer E, Hölzel D (2002) Clinical and epidemiological data of patients with malignomas of the head and neck. *Laryngorhinootologie* 81(7): 499-508
- Laverick S, Lowe D, Brown JS, Vaughan ED, Rogers SN (2004) The impact of neck dissection on health-related quality of life. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 130(2): 149-154
- Layland MK, Sessions DG, Lenox J (2005) The influence of lymph node metastasis in the treatment of squamous cell carcinoma of the oral cavity, oropharynx, larynx, and hypopharynx: N0 versus N+. *Laryngoscope* 115(4): 629-639
- Lee CT, Chang CY, Lee YC, Tai CM, Wang WL, Tseng PH, Hwang JC, Hwang TZ, Wang CC, Lin JT (2010) Narrow-band imaging with magnifying endoscopy for the screening of esophageal cancer in patients with primary head and neck cancers. *Endoscopy* 42(8): 613-619
- Lehmusvuori A, Tapio AH, Mäki-Teeri P, Rantakokko-Jalava K, Wang Q, Takalo H, Soukka T (2013) Homogeneous duplex polymerase chain reaction assay using switchable lanthanide fluorescence probes. *Anal Biochem* 436(1): 16-21
- León X, Quer M, Orús C, Sancho FJ, Bagué S, Burgués J (2001) Selective dissection of levels II-III with intraoperative control of the upper and middle jugular nodes: a therapeutic option for the N0 neck. *Head Neck* 23(6): 441-446
- Leslie A, Fyfe E, Guest P, Goddard P, Kabala JE (1999) Staging of squamous cell carcinoma of the oral cavity and oropharynx: a comparison of MRI and CT in T- and N- staging. *J Comput Assist Tomogr* 23(1): 43-49
- Levi F, Pasche C, Lucchini F, Chatenoud L, Jacobs DR Jr, La Vecchia C (2000) Refined and whole grain cereals and the risk of oral, oesophageal and laryngeal cancer. *Eur J Clin Nutr* 54(6): 487-489

- Li Q, Wu D, Liu WW, Li H, Liao WG, Zhang XR; Liu ZM, Guoand ZM, Liu XK (2013) Survival impact of cervical metastasis in squamous cell carcinoma of hard palate. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol* 116(1): 23-27
- Lianidou ES, Markou A (2011) Circulating tumor cells in breast cancer: detection systems, molecular characterization, and future challenges. *Clin Chem* 57(9): 1242-1255
- Liaw GA, Yen CY, Chiang WF, Lee CH, Yang C, Chiou CT, Liu SY (2006) Outcome of treatment with total main tumor resection and supraomohyoid neck dissection in oral squamous cell carcinoma. *J Formos Med Assoc* 105(12): 971-977
- Lim YC, Song MH, Kim SC, Kim KM, Choi EC (2004) Preserving level IIb lymph nodes in elective supraomohyoid neck dissection for oral cavity squamous cell carcinoma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 130(9): 1088-1091
- Lingen MW, Xiao W, Schmitt A, Jiang B, Pickard R; Kreinbrink P; Perez-Ordenez B, Jordan RC; Gillison ML (2013) Low etiologic fraction for high-risk human papillomavirus in oral cavity squamous cell carcinomas. *Oral Oncol* 49(1): 1-8
- Linton OR, Moore MG, Brigance JS, Gordon CA, Summerlin DJ, McDonald MW (2013) Prognostic significance of basaloid squamous cell carcinoma in head and neck cancer. *JAMA Otolaryngol Head Neck Surg* 139(12): 1306-1311
- Liu M, Wang SJ, Yang X, Peng H (2017) Diagnostic Efficacy of Sentinel Lymph Node Biopsy in Early Oral Squamous Cell Carcinoma: A Meta-Analysis of 66 Studies. *PLoS One* 12(1): e0170322
- Lock JG, Wehrle-Haller B, Strömblad S (2008) Cell-matrix adhesion complexes: master control machinery of cell migration. *Semin Cancer Biol* 18(1): 65-76
- Löhler J, Gerstner AO, Bootz F, Walther LE (2014) Incidence and localization of abnormal mucosa findings in patients consulting ENT outpatient clinics and data analysis of a cancer registry. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 271(5): 1289-1297
- Loree TR, Strong EW (1990) Significance of positive margins in oral cavity squamous carcinoma. *Am J Surg* 160(4): 410-414
- Luukkaa M, Aitasalo K, Pulkkinen J, Lindholm P, Valavaara R, Grønman R (2002) Neodymium YAG contact laser in the treatment of cancer of the mobile tongue. *Acta Otolaryngol* 122(3):318-322
- Macfarlane GJ, Boyle P, Scully C (1992) Oral cancer in Scotland: changing incidence and mortality. *BMJ* 305(6862): 1121-1123
- Maeda M, Johnson KR, Wheelock MJ (2005) Cadherin switching: Essential for behavioral but not morphological changes during an epithelium to mesenchyme transition. *J Cell Sci* 118(5): 873-887

- Maekitie AA, Beasley NJ, Neligan PC, Lipa J, Gullane PJ, Gilbert RW (2003) Head and neck reconstruction with anterolateral thigh flap. *Otolaryngol Head Neck Surgery* 129(5): 547-555
- Maheswaran S, Sequist LV, Nagrath S, Ulkus L, Brannigan B, Collura CV, Inserra E, Diederichs S, Iafrate AJ, Bell DW, Digumarthy S, Muzikansky A, Irimia D, Settleman J, Tompkins RG, Lynch TJ, Toner M, Haber DA (2008) Detection of mutations in EGFR in circulating lung-cancer cells. *N Engl J Med* 359(4): 366-377
- Mani SA, Yang J, Brooks M, Schwaninger G, Zhou A, Miura N, Kutok JL, Hartwell K, Richardson AL, Weinberg RA (2007) Mesenchyme Forkhead 1 (FOXC2) plays a key role in metastasis and is associated with aggressive basal-like breast cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(24): 10069-10074
- Mani SA, Guo W, Liao MJ, Eaton EN, Ayyanan A, Zhou AY, Brooks M, Reinhard F, Zhang CC, Shipitsin M, Campbell LL, Polyak K, Brisken C, Yang J, Weinberg RA (2008) The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell* 133(4): 704-715
- Margadant C, Sonnenberg A (2010) Integrin-TGF-beta crosstalk in fibrosis, cancer and wound healing. *EMBO Rep* 11(2): 97-105
- Mascitti M, Orsini G, Tosco V, Monterubbianesi R, Balercia A, Putignano A, Procaccini M, Santarelli A (2018) An overview on current non-invasive diagnostic devices in oral oncology. *Front Physiol* 9: 1510
- Mazeron JJ, Crook JM, Benck V, Marinello G, Martin M, Raynal M, Haddad E, Peynegre R, Le Bourgeois JP, Walop W (1990) Iridium 192 implantation of T1 and T2 carcinomas of the mobile tongue. *International J Radiat Oncol Biol Phys* 19(6): 1369-1376
- Mazumder S, Datta S, Ray JG, Chaudhuri K, Chatterjee R (2019) Liquid biopsy: miRNA as a potential biomarker in oral cancer. *Cancer Epidemiol* 58: 137-145
- McGuirt WF Jr, Johnson JT, Myers EN, Rothfield R, Wagner R (1995) Floor of mouth carcinoma. The management of the clinically negative neck. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 121(3): 278-282
- McMahon J, O'Brien CJ, Pathak I, Hamill R, McNeil E, Hammersley N, Gardiner S, Junor E (2003) Influence of condition of surgical margins on local recurrence and disease-specific survival in oral and oropharyngeal cancer. *Br J Oral Maxillofac Surg* 41(4): 224-231
- Medici D, Hay ED, Olsen BR (2008) Snail and Slug promote epithelial-mesenchymal transition through beta-catenin-T-cell factor-4-dependent expression of transforming growth factor-beta3. *Mol Biol Cell* 19(11): 4875-4887

- Miller AB (1974) The epidemiology of oral cancer. *Dent J* 40(3): 211-217
- Mohanti BK, Umapathy H, Bahadur S, Thakar A, Pathy S (2004) Short course palliative radiotherapy of 20 Gy in 5 fractions for advanced and incurable head and neck cancer: AIIMS study. *Radiother Oncol* 71(3): 275-280.
- Moya-Plana A, Aupérin A, Guerlain J, Gorphe P, Casiraghi O, Mamelle G, Melkane A, Lumbroso J, Janot F, Terman S (2018) Sentinel node biopsy in early oral squamous cell carcinomas: Long-term follow-up and nodal failure analysis. *Oral Oncol* 82: 187-194
- Namaki S, Matsumoto M, Ohba H, Tanaka H, Koshikawa N, Shinohara M (2004) Masticatory efficiency before and after surgery in oral cancer patients: comparative study of glossectomy, marginal mandibulectomy and segmental mandibulectomy. *J Oral Sci* 46(2): 113-117
- Ndiaye C, Mena M, Alemany L; Arbyn A, Castellsagué X, Laporte L, Bosch FX, De Sanjosé S; Trottier H (2014) HPV DNA, E6/E7 mRNA, and p16INK4a detection in head and neck cancers: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Oncol* 15(12): 1319-1331
- Negrini S, Gorgoulis VG, Halazonetis TD (2010) Genomic instability - an evolving hallmark of cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11(3): 220-228
- Newell R, Ziegler L, Stafford N, Lewin RJ (2004) The information needs of head and neck cancer patients prior to surgery. *Ann R Coll Surg Engl* 86(6): 407-410
- Nieberler M, Reuning U, Reichart F, Notni J, Wester H-J, Schwaiger M, Weinmüller M, Räder A, Steiger K, Kessler H (2017) Exploring the Role of RGD-Recognizing Integrins in Cancer. *Cancers (Basel)* 4;9(9): 116
- Nieuwenhuis EJ, Castelijns JA, Pijpers R, van den Brekel MW, Brakenhoff RH, van der Waal I, Snow GB, Leemans CR (2002) Wait-and-see policy for the N0 neck in early- stage oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma using ultrasonography-guided cytology: is there a role for identification of the sentinel node? *Head Neck* 24(3): 282-289
- Nishimaki T, Kanda T, Nakagawa S, Kosugi S, Tanabe T, Hatakeyama K (2002) Outcomes and prognostic factors after surgical resection of hypopharyngeal and cervical esophageal carcinomas. *Int Surg* 87(1): 38-44
- Nordheim A, Knippers R (2001) Molekulare Genetik, Thieme Verlag, 11.Auflage, ISBN 3132426377
- Nowell PC (1976) The clonal evolution of tumor cell populations. *Science* 194(4260): 23-28

- O'Brien CJ, Traynor SJ, McNeil E, McMahon JD, Chaplin JM (2000) The use of clinical criteria alone in the management of the clinically negative neck among patients with squamous cell carcinoma of the oral cavity and oropharynx. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 126(3): 360-365
- O'Brien CJ, Lauer CS, Fredricks S, Clifford AR, McNeil EB, Bagia JS, Koulmandas C (2003b) Tumor thickness influences prognosis of T1 and T2 oral cavity cancer-but what thickness? *Head Neck* 25(11): 937-945
- Ohizumi Y, Tamai Y, Imamiya S, Akiba T (2002) Complications following re-irradiation for head and neck cancer. *Am J Otolaryngol* 23(4): 215-221
- Oreggia F, De Stefani E, Boffetta P, Brennan P, Deneo-Pellegrini H, Ronco AL (2001) Meat, fat and risk of laryngeal cancer: a case-control study in Uruguay. *Oral Oncol* 37(2): 141-145
- Ozkumur E, Shah AM, Ciciliano JC, Emmink BL, Miyamoto DT, Brachtel E, Yu M, Chen PI, Morgan B, Trautwein J et al. (2013) Inertial focusing for tumor antigen-dependent and -independent sorting of rare circulating tumor cells. *Sci Transl Med* 5(179): 179ra47
- Pagedar NA, Gilbert RW (2009) Selective neck dissection: a review of the evidence. *Oral Oncol* 45(4-5): 416-420
- Pantel K, Alix-Panabières C (2013) Real-time liquid biopsy in cancer patients: fact or fiction? *Cancer Res* 73(21): 6384-6388
- Panzarella V, Pizzo G, Calvino F, Compilato D, Colella G, Campisi G (2014) Diagnostic delay in oral squamous cell carcinoma: the role of cognitive and psychological variables. *Int J Oral Sci* 6(1): 39-45
- Parkinson DR, Dracopoli N, Petty BG, Compton C, Christofanilli M, Deisseroth A, Hayes DF, Kapke G, Kumar P, Lee JS et al. (2012) Considerations in the development of circulating tumor cell technology for clinical use. *J Transl Med* 10: 138
- Parsons JT, Mendenhall WM, Stringer SP, Cassisi NJ, Million RR (1997) An analysis of factors influencing the outcome of postoperative irradiation for squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 39(1): 137-148
- Patel RS, Clark JR, Gao K, O'Brien CJ (2008) Effectiveness of selective neck dissection in the treatment of the clinically positive neck. *Head Neck* 30(9): 1231-1236
- Paul N, Shum J, Le T (2010) Hot start PCR. *Methods Mol Biol* 630: 301-318



- Peiffert D, Pernot M, Malissard L, Aletti P, Hoffstetter S, Kozminski P, Luporsi E, Dartois D, Bey P (1994) Salvage irradiation by brachytherapy of velotonsillar squamous cell carcinoma in a previously irradiated field: results in 73 cases. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 29(4): 681-686
- Pellitteri PK, Robbins KT, Neumann T (1997) Expanded application of selective neck dissection with regard to nodal status. *Head Neck* 19(4): 260-265
- Pericot J, Escribà JM, Valdés A, Biosca MJ, Monner A, Castellsagué X, Galiana R, Piulachs P, Escutia E, Mari A (2000) Survival evaluation of treatment modality in squamous cell carcinoma of the oral cavity and oropharynx. *J Craniomaxillofac Surg* 28(1): 49-55
- Petit V, Thiery JP (2000) Focal adhesions: structure and dynamics. *Biol Cell* 92(7): 477-494
- Pignon JP, Bourhis J, Domenge C, Designé L (2000) Chemotherapy added to locoregional treatment for head and neck squamous-cell carcinoma: three meta-analyses of updated individual data. MACH-NC Collaborative Group. Meta-Analysis of Chemotherapy on Head and Neck Cancer. *Lancet* 355(9208): 949-955
- Pitiphat W, Diehl SR, Laskaris G, Cartsos V, Douglass CW, Zavras AI (2002) Factors associated with delay in the diagnosis of oral cancer. *J Dent Res* 81(3): 192-197
- Plaks V, Koopman CD, Werb Z (2013) Circulating tumor cells. *Science* 341: 1186-1188
- Plataniotis GA, Theofanopoulou ME, Kalogera-Fountzila A, Haritanti A, Ciuleanu E, Ghilezan N, Zamboglou N, Dimitriadis A, Sofroniadis I, Fountzilias G (2004) Prognostic impact of tumor volumetry in patients with locally advanced head-and-neck carcinoma (non-nasopharyngeal) treated by radiotherapy alone or combined radiochemotherapy in a randomized trial. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 59(4): 1018-1026
- Poeschl PW, Russmueller G, Seemann R, Klug C, Poeschl E, Sulzbacher I, Ewers R (2011) Staging and grading as prognostic factors in maxillary squamous cell carcinoma. *J Oral Maxillofac Surg* 69(12): 3038-3044
- Poh CF, Ng S, Berean KW, Williams PM, Rosin MP, Zhang L (2008) Biopsy and histopathologic diagnosis of oral premalignant and malignant lesions. *J Can Dent Assoc* 74(3): 283-288
- Pool EH, Dunlop GR (1934) Cancer cells in the blood stream. *Am J Cancer* 21: 99-103
- Pruvost M, Grange T, Geigl EM (2005) Minimizing DNA contamination by using UNG-coupled quantitative real-time PCR on degraded DNA samples: application to ancient DNA studies. *Biotechniques* 38(4): 569-575

- Rai K H, Ahmed J (2019) A Correlative Study of N-Cadherin Expression with Different Grades of Oral Squamous Cell Carcinoma Projecting as a Marker of Epithelial to Mesenchymal Transition in Tumor Progression. *Asian Pac J Cancer Prev* 20(8): 2327-2332
- Rapoport A, Ortellado DK, Amar A, Lehn CN, Dedivitis RA, Perez RS, Rodrigues HM (2007) Radical versus supraomohyoid neck dissection in the treatment of squamous cell carcinoma of the inferior level of the mouth. *Braz J Otorhinolaryngol* 73(5): 641-646
- Razavi SM, Siadat S, Rahbar P, Hosseini SM, Shirani AM (2012) Trends in oral cancer rates in Isfahan, Iran during 1991-2010. *Dent Res J (Isfahan)* 9(1): 88-93
- Reddy VM, Cundall-Curry D, Bridger MW (2010) Trends in the incidence rates of tonsil and base of tongue cancer in England, 1985-2006. *Ann R Coll Surg Engl* 92(8): 655-659
- Rhim AD, Mirek ET, Aiello NM, Maitra A, Bailey JM, McAllister F, Reichert M, Beatty GL, Rustgi AK, Vonderheide RH, Leach SD, Stanger BZ (2012) EMT and dissemination precede pancreatic tumor formation. *Cell* 148(1-2): 349-361
- Riahi R, Gogoi P, Sepehri S, Zhou Y, Handique K, Godsey J, Wang Y (2014) A novel microchannel-based device to capture and analyze circulating tumor cells (CTCs) of breast cancer. *Int J Oncol* 44(6): 1870-1878
- Rivera C (2015) Essentials of oral cancer. *Int J Clin Exp Pathol* 8(9): 11884-11894
- Robbins KT, Clayman G, Levine PA, Medina J, Sessions R, 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
- Robertson C, Robertson AG, Hendry JH, Roberts SA, Slevin NJ, Duncan WB, MacDougall RH, Kerr GR, O'Sullivan B, Keane TJ (1998) Similar decreases in local tumor control are calculated for treatment protraction and for interruptions in the radiotherapy of carcinoma of the larynx in four centers. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 40(2): 319-329
- Rodgers LW Jr, Stringer SP, Mendenhall WM, Parsons JT, Cassisi NJ, Million RR et al. (1993) Management of squamous cell carcinoma of the floor of mouth. *Head Neck* 15(1): 16-19
- 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(2): 207-213

- Rogers SN, Devine J, Lowe D, Shokar P, Brown JS, Vaugman ED (2004) Longitudinal health-related quality of life after mandibular resection for oral cancer: a comparison between rim and segment. *Head Neck* 26(1): 54-62
- Rogers SN, Brown JS, Woolgar JA, Lowe D, Magennis P, Shaw RJ, Sutton D, Errington D, Vaughan D (2009) Survival following primary surgery for oral cancer. *Oral Oncol* 45(3): 201-211
- Sanguineti G, Richetti A, Bignardi M, Corvo R, Gabriele P, Sormani MP, Antognoni P (2005) Accelerated versus conventional fractionated postoperative radiotherapy for advanced head and neck cancer: results of a multicenter Phase III study. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 61(3): 762-771
- Sankaranarayanan R, Masuyer E, Swaminathan R, Ferlay J, Whelan S (1998) Head and neck cancer: a global perspective on epidemiology and prognosis. *Anticancer research* 18(6B): 4779-4786
- Santoro R, Franchi A, Gallo O, Burali G, de' Campora E (2008) Nodal metastases at level IIb during neck dissection for head and neck cancer: clinical and pathologic evaluation. *Head Neck* 30(11): 1483-1487
- Saraiya M, Unger ER, Thompson TD; Lynch CF, Hernandez BY, Lyu CW, Steinau M, Watson M, Wilkinson EJ, Hopenhayn C, Copeland G, Cozen W, Peters ES, Huang Y, Saber MS, Altekruse S, Goodman MT (2015) US assessment of HPV types in cancers: implications for current and 9-valent HPV vaccines. *J Natl Cancer Inst* 107(6): djv086
- Sarioglu AF, Aceto N, Kojic N, Donaldson MC, Zeinali M, Hamza B, Engstrom A, Zhu H, Sundaresan TK, Miyamoto DT et al. (2015) A microfluidic device for label-free, physical capture of circulating tumor cell clusters. *Nat Methods* 12(7): 685-691
- Schroeder A, Mueller O, Stocker S, Salowsky R, Leiber M, Gassmann M, Lightfoot S, Menzel W, Granzow M, Ragg T (2006) The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. *BMC Mol Biol* 7: 3
- Schwager K, Nebel A, Baier G, Hoppe F (2000) Second primary carcinomas in the upper aerodigestive tract in different locations and age groups. *Laryngorhinotologie* 79(10): 599-603
- Schwarzenbach H, Hoon DS, Pantel K (2011) Cell-free nucleic acids as biomarkers in cancer patients. *Nat Rev Cancer* 11(6): 426-437
- Schwenzer N, Ehrenfeld M (2011) Mund- Kiefer- Gesichtschirurgie. Stuttgart: Thieme Verlag. 4.Auflage. 83

- Scully C, Bagan J (2009) Oral squamous cell carcinoma: overview of current understanding of aetiopathogenesis and clinical implications. *Oral Dis* 15(6): 388-399
- Seitz O, Chambron-Pinho N, Middendorp M, Sader R, Mack M, Vogl TJ, Bisdas S (2009) 18F-Fluorodeoxyglucose-PET/CT to evaluate tumor, nodal disease, and gross tumor volume of oropharyngeal and oral cavity cancer: comparison with MR imaging and validation with surgical specimen. *Neuroradiology* 51(10): 677-686
- Shah JP, Candela FC, Poddar AK (1990) The patterns of cervical lymph node metastases from squamous carcinoma of the oral cavity *Cancer*. 66(1) :109-113
- Shah JP, Gil Z (2009) Current concepts in management of oral cancer-Surgery. *Oral Oncol* 45(4-5): 394-401
- Shi Y, Massagué J (2003) Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell* 113(6): 685-700
- Shiboski CH, Shiboski SC, Silverman S Jr (2000) Trends in oral cancer rates in the United States, 1973-1996. *Community Dent Oral Epidemiol* 28(4): 249-256
- Siravegna G, Marsoni S, Siena S, Bardelli A (2017) Integrating liquid biopsies into the management of cancer. *Nat Rev Clin Oncol* 14(9): 531-548
- Smith GI, O'Brien CJ, Clark J, Shannon KF, Clifford AR, McNeil EB, Gao K (2004) Management of the neck in patients with T1 and T2 cancer in the mouth. *Br J Oral Maxillofac Surg* 42(6): 494-500
- Smythe WR, LeBel E, Bavaria JE, Kaiser LR, Albelda SM (1995) Integrin expression in non-small cell carcinoma of the lung. *Cancer Metastasis Rev* 14(3): 229-239
- Spaderna S, Schmalhofer O, Wahlbuhl M, Dimmler A, Bauer K, Sultan A, Hlubek F, Jung A, Strand D, Eger A, Kirchner T, Behrens J, Brabletz T (2008) The transcriptional repressor ZEB1 promotes metastasis and loss of cell polarity in cancer. *Cancer Res* 68(2): 537-544
- Spiro RH, Morgan GJ, Strong EW, Shah JP (1996) Supraomohyoid neck dissection. *Am J Surg* 172(6): 650-653
- Spiro RH, Guillaumondegui O Jr, Paulino AF, Huvos AG (1999) Pattern of invasion and margin assessment in patients with oral tongue cancer. *Head Neck* 21(5): 408-413
- Stadler ZK, Thom P, Robson ME, Weitzel JN, Kauff ND, Hurley KE, Devlin V, Gold B, Klein RJ, Offit K (2010) Genomewide association studies of cancer. *J Clin Oncol* 28(27): 4255-4267

- Stevens CM, Huang SH, Fung S, Bayley AJ, Cho JB, Cummings BJ, Dawson LA, Hope AJ, Kim JJ, O'Sullivan B, Waldron JN, Ringash J (2011) Retrospective study of palliative radiotherapy in newly diagnosed head and neck carcinoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 81(4): 958-963
- Stokkel MP, ten Broek FW, Hordijk GJ, Koole R, van Rijk PP (2000) Preoperative evaluation of patients with primary head and neck cancer using dual-head 18fluorodeoxyglucose positron emission tomography. *Ann Surg* 231(2): 229-234
- Suh JD, Sercarz JA, Abermayor E, Calcaterra TC, Rawnsley JD, Alam D, Blackwell KE (2004) Analysis of outcome and complications in 400 cases of microvascular head and neck reconstruction. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 130(8): 962-966
- Syrjänen S, Lodi G, Von Bültzingslöwen I, Aliko A, Arduino P, Campisci G, Challacombe S, Ficarra G, Flaitz C, Zhou HM, Maeda H, Miller C, Jontell M (2011) Human papillomaviruses in oral carcinoma and oral potentially malignant disorders: a systematic review. *Oral Dis* 17(1): 58-72
- Tada H, Takahashi H, Kuwabara-Yokobori Y, Shino M, Chikamatsu K (2020) Molecular profiling of circulating tumor cells predicts clinical outcome in head and neck squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 102(104558)
- Talamini R, Bosetti C, La Vecchia C, Dal Maso L, Levi F, Bidoli E, Negri E, Pasche C, Vaccarella S, Barzan L, Franceschi S (2002) Combined effect of tobacco and alcohol on laryngeal cancer risk: a case-control study. *Cancer Causes Control* 13(10): 957-964
- Takenaka R, Kawahara Y, Okada H, Hori K, Inoue M, Kawano S, Tanioka D, Tsuzuki T, Uemura M, Ohara N, Tominaga S, Onoda T, Yamamoto K (2009) Narrow-band imaging provides reliable screening for esophageal malignancy in patients with head and neck cancers. *American Journal of Gastroenterology* 104(12): 2942-2948
- Taki M, Verschueren K, Yokoyama K, Nagayama M, Kamata N (2006) Involvement of Ets-1 transcription factor in inducing matrix metalloproteinase-2 expression by epithelial-mesenchymal transition in human squamous carcinoma cells. *Int J Oncol* 28(2): 487-496
- Tan SC, Yiap BC (2009) DNA, RNA, and protein extraction: the past and the present. *J Biomed Biotechnol* 574398
- Thiery JP (2002) Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat Rev Cancer* 2(6): 442-454
- Thiery JP, Sleeman JP (2006) Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7(2): 131-142

- To EW, Tsang WM, Cheng J, Lai E, Pang P, Ahuja AT, Ying M (2003) Is neck ultrasound necessary for early stage oral tongue carcinoma with clinically No neck? *Dento-Maxillo-Facial Radiology* 32(3): 156-159
- Tong AC, Leung AC, Cheng JC, Sham J (1999) Incidence of complicated healing and osteoradionecrosis following tooth extraction in patients receiving radiotherapy for treatment of nasopharyngeal carcinoma. *Aust Dent J* 44(3): 187-194
- Tse JC, Kalluri R (2007) Mechanisms of metastasis: epithelial-to-mesenchymal transition and contribution of tumor microenvironment. *J Cell Biochem* 101(4): 816-829
- Turner SL, Slevin NJ, Gupta NK, Swindell R (1996) Radical external beam radiotherapy for 333 squamous carcinomas of the oral cavity- evaluation of late morbidity and a watch policy for the clinically negative neck. *Radiother Oncol* 41(1): 21-29
- Valastyan S, Weinberg RA (2011) Tumor metastasis: molecular insights and evolving paradigms. *Cell* 147(2): 275-292
- Van Cann EM, Koole R, Oyen WJ, de Rooy JW, de Wilde PC, Slootweg PJ, Schipper M, Merks MA, Stoelinga PJ (2008) Assessment of mandibular invasion of squamous cell carcinoma by various modes of imaging: constructing a diagnostic algorithm. *Int J Oral Maxillofac Surg* 37(6): 535-541
- Van den Brekel MW, Castelijns JA, Stel HV, Golding RP, Meyer CJ, Snow GB (1993) Modern imaging techniques and ultrasound-guided aspiration cytology for the assessment of neck node metastases: a prospective comparative study. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 250(1): 11-17
- Van den Brekel MW, Castelijns JA, Snow GB (1998) Diagnostic evaluation of the neck. *Otolaryngol Clin North Am* 31(4): 601-620
- Van der Flier A, Sonnenberg A (2001) Function and interactions of integrins. *Cell Tissue Res* 305(3): 285-298
- Van der Waal I, Scully C (2011) Oral cancer: comprehending the condition, causes, controversies, control and consequences. 6. Co-morbidities. *Dent Update* 38(4): 283-284
- Varner JA, Cheresch DA (1996) Integrins and cancer. *Curr Opin Cell Biol* 8(5): 724-730
- Vermorken JB, Mesia R, Rivera F, Remenar E, Kaweckki A, Rottey S, et al. (2008) Platinum-based chemotherapy plus cetuximab in head and neck cancer. *N Engl J Med* 359(11) 1116-1127
- Vidiri A, Ruscito P, Pichi B, Pellini R, Covello R, Sperduti I, Di Giovanni S, Spriano G, Crecco M (2007) Oral cavity and base of the tongue tumors. Correlation between clinical, MRI and pathological staging of primary tumor. *J Exp Clin Cancer Res* 26 (4): 575-582

- Vidiri A, Guerrisi A, Pellini R, Manciooco V, Covello R, Mattioni O, Guerrisi I, Di Giovanni S, Spriano G, Crecco M (2010) Multi-detector row computed tomography (MDCT) and magnetic resonance imaging (MRI) in the evaluation of the mandibular invasion by squamous cell carcinomas (SCC) of the oral cavity. Correlation with pathological data. *J Exp Clin Cancer Res* 29(1): 73
- Vokes EE, Weichselbaum RR, Lippmann SM, Hong WK (1993) Head and Neck cancer. *N Engl J Med* 328(3): 184-194
- Voulgari A, Pintzas A (2009) Epithelial-mesenchymal transition in cancer metastasis: mechanisms, markers and strategies to overcome drug resistance in the clinic. *Biochim Biophys Acta* 1796(2): 75-90
- Wang J, Chang S, Li G, Sun Y (2017) Application of liquid biopsy in precision medicine: opportunities and challenges. *Front Med* 11(4): 522-527
- 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(2): 107-109
- Weijers M, Snow GB, Bezemer PD, van der Wal JE, van der Waal I (2002) The clinical relevance of epithelial dysplasia in the surgical margins of tongue and floor of mouth squamous cell carcinoma: an analysis of 37 patients. *J Oral Pathol Med* 31(1): 11-15
- Weinberg RA (2008) Twisted epithelial-mesenchymal transition blocks senescence. *Nat Cell Biol* 10(9): 1021-1023
- Wenzel S, Koch U (2004). Squamous cell carcinomas of the upper aerodigestive tract. Prognostic significance of the capsular rupture and extracapsular spread of lymph node metastases. *HNO* 52(9): 783-789
- Wiener E, Pautke C, Link TM, Neff A, Kolk A (2006) Comparison of 16-slice MSCT and MRI in the assessment of squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Eur J Radiol* 58(1): 113-118
- Wolfensberger M, Zbaeren P, Dulguerov P, Müller W, Arnoux A, Schmid S (2001) Surgical treatment of early oral carcinoma-results of a prospective controlled multicenter study. *Head Neck* 23(7): 525-530
- Wolff D, Hassfeld S, Hofele C (2004) Influence of marginal and segmental mandibular resection on the survival rate in patients with squamous cell carcinoma of the inferior parts of the oral cavity. *J Craniomaxillofac Surg* 32(5): 318-323

- Wolff K-D, Al-Nawas B, Al-Sharif U, Beck J, Bikowski K, Bissinger O, Böhme P, Bönte-Hieronimus I, Bootz F, Bozzato A, Budach W, Burkhardt A, Danker H, Eberhardt W, Engers K, Fietkau R, Frerich B, Gauler T, Gehrmann-Weide K, Germann G, Giannakopoulos N, Gittler-Hebestreit N, Grötz K, Hertrampf K, Hoffmann J, Horch R, Ihrler S, Kaufmann R, Kehrer A, Keilholz U, Klußmann P, Kolk A, Lell M, Lübbe A, Mantey W, Mischkowski R, Moll R, Nieberler M, Nusser-Müller-Busch R, Pistner H, Paradies K, Rau A, Reichert T, Reinert S, Schilling B, Schliephake H, Schmidt K, Schmitter M, Singer S, Terheyden H, Troost E, Waterboer T, Westhofen M, Weitz J, Wirz S, Wittlinger M, Zöphel K (2021) S3 Leitlinie Mundhöhlenkarzinom AWMW. Berlin
- Woolgar JA, Rogers SN, Lowe D, Brown JS, Vaughan ED (2003) Cervical lymph node metastasis in oral cancer: the importance of even microscopic extracapsular spread. *Oral Oncol* 39(2): 130-137
- Woolgar JA, Triantafyllou A (2005) A histopathological appraisal of surgical margins in oral and oropharyngeal cancer resection specimens. *Oral Oncol* 41(10): 1034-1043
- Woolgar JA (2006) Histopathological prognosticators in oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 42(3): 229-239
- Yang J, Mani SA, Weinberg RA (2006) Exploring a new twist on tumor metastasis. *Cancer Res* 66(9): 4549-4552
- Yang J, Weinberg RA (2008) Epithelial-mesenchymal transition: at the crossroads of development and tumor metastasis. *Dev Cell* 14(6): 818-829
- Yete S, D'Souza W, Saranath D (2018) High-Risk Human Papillomavirus in Oral Cancer: Clinical Implications. *Oncology* 94(3): 133-141
- Yokoyama K, Kamata N, Hayashi E, Hoteiya T, Ueda N, Fujimoto R, Nagayama M (2001) Reverse correlation of E-cadherin and snail expression in oral squamous cell carcinoma cells in vitro. *Oral Oncol* 37(1): 65-71
- Yu S, Li J, Li Z, Zhang W, Zhao J (2006) Efficacy of supraomohyoid neck dissection in patients with oral squamous cell carcinoma and negative neck. *Am J Surg* 191(1): 94-99
- Zheng Z, Park JY, Guillemette C; Schantz SP, Lazarus P (2001) Tobacco carcinogen-detoxifying enzyme UGT1A7 and its association with orolaryngeal cancer risk. *J Natl Cancer Inst* 93(18): 1411-1418
- Zheng Y, Shen H, Sturgis EM, Wang LE, Eicher SA, Strom SS, Frazier ML, Spitz MR, Wei Q (2001) Cyclin D1 polymorphism and risk for squamous cell carcinoma of the head and neck: a case-control study. *Carcinogenesis* 22(8): 1195-1199



## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schritte bei der Metastasierung.....	31
Abbildung 2: Blutkomponenten nach der Zentrifugation .....	44
Abbildung 3: Säulenchromatographie.....	46
Abbildung 4: Prozedur RNeasy Mini Kit.....	50
Abbildung 5: PCR-Zyklus.....	56
Abbildung 6: Altersverteilung der erkrankten Personen.....	63
Abbildung 7: Altersverteilung der gesunden Personen.....	64
Abbildung 8: Darstellung der Altersverteilung bei den Erkrankten versus den Gesunden als Boxplot-Diagramm.....	64
Abbildung 9: Graphische Darstellung der geschlechtsbezogenen Altersverteilung der Erkrankten.....	65
Abbildung 10: Häufigkeitsverteilung des T-Stagings bei Personen mit einem oralen Plattenepithelkarzinom .....	67
Abbildung 11: Häufigkeitsverteilung des N-Stagings bei Personen mit einem oralen Plattenepithelkarzinom .....	68
Abbildung 12: Häufigkeitsverteilung des Gradings bei Personen mit einem oralen Plattenepithelkarzinom .....	69
Abbildung 13: Häufigkeitsverteilung der Beurteilung des Resektionsrands bei Personen mit einem oralen Plattenepithelkarzinom.....	70
Abbildung 14: Häufigkeitsverteilung des AJCC-Stadiums bei Personen mit einem oralen Plattenepithelkarzinom .....	72
Abbildung 15: Graphische Darstellung der Einzelmesswerte im Bereich von 0 bis 250.....	73
Abbildung 16: Graphische Darstellung der Einzelmesswerte im Bereich von 0 bis 20 ....	74
Abbildung 17: Boxplot-Diagramm zur Darstellung der Expression von $\beta 6$ -mRNA bei erkrankten und gesunden Personen.....	76
Abbildung 18: Graphische Darstellung des Medians von Erkrankten versus Gesunden...	77

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Symptome des Plattenepithelkarzinoms der Mundhöhle.....	7
Tabelle 2:	TNM-Klassifikation des oralen Plattenepithelkarzinoms nach UICC.....	10
Tabelle 3:	Definition der Präfixe .....	11
Tabelle 4:	Certainty-Index (Sicherheitsfaktor) .....	12
Tabelle 5:	Stadieneinteilung der American Joint Committee on Cancer.....	12
Tabelle 6:	Differenzierungsgrad des Tumorgewebes .....	14
Tabelle 7:	Lymphknotenlevel .....	17
Tabelle 8:	Nomenklatur der Halslymphknotenausräumung .....	17
Tabelle 9:	Verbrauchsmaterial .....	40
Tabelle 10:	Geräte .....	41
Tabelle 11:	Kommerzielle Kits .....	41
Tabelle 12:	RNA-/Primer-Mischungsverhältnisse.....	52
Tabelle 13:	RNA-/Primer-Mischungsverhältnisse bei 8 µg RNA .....	53
Tabelle 14:	Master-Mix-Mischungsverhältnisse .....	53
Tabelle 15:	Master-Mix mit ITG B6, GAPDH und Primer A/B .....	59
Tabelle 16:	Algorithmus der qRT-PCR .....	61
Tabelle 17:	Geschlechterverteilung in der Gruppe der erkrankten und gesunden Personen.....	62
Tabelle 18:	Altersverteilung in der Gruppe der erkrankten und gesunden Personen ...	63
Tabelle 19:	Geschlechtsbezogene Altersverteilung der Erkrankten .....	66
Tabelle 20:	Geschlechtsbezogene Altersverteilung der Gesunden .....	66
Tabelle 21:	Lymphgefäßinfiltration .....	71
Tabelle 22:	Perineuronale Invasion.....	71
Tabelle 23:	Extrakapsuläre Ausdehnung von Lymphknotenmetastasen .....	71
Tabelle 24:	Tabellarische Gegenüberstellung der Einzelmesswerte.....	75
Tabelle 25:	Deskriptive Werte zum Expressionslevel von $\beta 6$ -mRNA, getrennt nach Gruppen .....	75
Tabelle 26:	Rangbildung in der Gruppe der Erkrankten und Gesunden.....	78
Tabelle 27:	Statistik für Test <sup>a</sup> Gruppe .....	78
Tabelle 28:	Gruppenstatistiken zum Alter .....	79
Tabelle 29:	Test bei unabhängigen Stichproben .....	79

---

Tabelle 30:	Deskriptive Werte zur Expression von $\beta 6$ -mRNA bezogen auf AJCC-Code .....	81
Tabelle 31:	Deskriptive Werte zur Expression von $\beta 6$ -mRNA bezogen auf Tumorstadium .....	81
Tabelle 32:	Deskriptive Werte zur Expression von $\beta 6$ -mRNA bezogen auf Nodal-Status .....	82
Tabelle 33:	Deskriptive Werte zur Expression von $\beta 6$ -mRNA bezogen auf Grading .....	82
Tabelle 34:	Deskriptive Werte zur Expression von $\beta 6$ -mRNA bezogen auf Resektionsrand .....	82
Tabelle 35:	Korrelationen zwischen Expression von $\beta 6$ -mRNA und Kategorien (AJCC-Code, G, T, N) nach Spearman-Rho.....	83
Tabelle 36:	Rangbildung Resektionsrand .....	84
Tabelle 37:	Statistik für Test <sup>a</sup> Resektionsrand .....	84
Tabelle 38:	Korrelationen zwischen Expression von $\beta 6$ -mRNA und Alter nach Spearman-Rho.....	85
Tabelle 39:	Korrelationen zwischen Expression von $\beta 6$ -mRNA und Alter, getrennt nach Gruppen, nach Spearman-Rho .....	85

### Tabellen im Anhang

Tabelle A 1:	In der Auswertung verwendete Daten der an einem oralen Plattenepithelkarzinom erkrankten Personen.....	iv
Tabelle A 2:	In der Auswertung verwendete Daten der gesunden Probanden .....	vi
Tabelle A 3:	Legende zu Tabelle A1 und A2 .....	vi
Tabelle A 4:	Ergebnisse der relativen real-time PCR der Erkrankten .....	vii
Tabelle A 5:	Ergebnisse der relativen real-time PCR der Gesunden.....	viii

## Anhang

In der Auswertung verwendete Daten der Patienten und der gesunden Probanden

**Tabelle A 1: In der Auswertung verwendete Daten der an einem oralen Plattenepithelkarzinom erkrankten Personen**

Nummer	Alter	Geschlecht	T	N	G	R	AJCC
1	49	m	2	4	2	8	IVA
2	72	w	2	1	2	8	III
3	53	w	2	0	2	0	II
4	74	m	2	3	2	8	IVA
5	57	m	2	8	3	0	II
6	80	m	3	0	4	0	III
7	49	m	4	1	3	0	IVA
8	49	m	2	3	2	0	IVA
9	54	m	9	9	3	9	9
10	75	w	4	4	2	8	IVA
11	29	m	4	3	2	9	IVA
12	63	m	4	8	2	1	IVA
13	42	m	1	1	2	0	III
14	66	m	2	0	2	0	II
15	66	m	8	1	2	9	III
16	56	w	1	0	2	0	I
17	64	m	4	4	2	0	IVA
18	84	w	1	8	3	0	I
19	29	m	4	3	3	8	IVA
20	77	m	4	0	2	1	IVA
21	48	m	1	0	2	0	I
22	58	w	4	3	3	0	IVA
23	79	w	2	0	2	0	II
24	66	m	4	0	2	0	IVA
25	72	w	4	0	2	9	IVA
26	71	m	2	0	2	0	II

<b>Nummer</b>	<b>Alter</b>	<b>Geschlecht</b>	<b>T</b>	<b>N</b>	<b>G</b>	<b>R</b>	<b>AJCC</b>
27	67	w	3	1	2	0	III
28	62	m	2	3	2	0	IVA
29	47	m	1	0	1	9	I
30	88	w	2	3	2	0	IVA
31	60	w	1	3	3	0	IVA
32	71	w	0	0	1	9	0
33	69	m	2	1	2	0	III
34	86	m	4	0	3	1	IVA
35	70	w	4	1	3	1	IVA
36	60	w	2	0	2	0	II
37	34	m	2	0	2	8	II
38	79	w	4	3	2	1	IVA
39	75	w	1	0	2	0	I
40	47	m	1	0	1	9	I
41	72	m	2	0	1	0	II
42	68	m	3	3	2	0	IVA
43	54	m	4	0	2	0	IVA
44	52	w	4	0	3	1	IVA
45	63	m	4	9	2	0	IVA
46	69	m	4	5	3	1	IVB
47	77	w	4	3	2	8	IVA
48	69	m	2	0	2	0	II
49	80	m	2	0	2	0	II
50	55	w	4	0	2	0	IVA
51	60	w	1	0	2	0	I
52	62	m	1	0	2	0	I
53	62	w	2	4	2	9	IVA
54	69	w	4	4	2	9	IVA
55	59	m	4	3	2	9	IVA

**Tabelle A 2: In der Auswertung verwendete Daten der gesunden Probanden**

<b>Nummer</b>	<b>Alter</b>	<b>Geschlecht</b>	<b>Nummer</b>	<b>Alter</b>	<b>Geschlecht</b>
1	33	w	18	64	w
2	26	w	19	49	w
3	40	m	20	59	m
4	33	w	21	39	m
5	57	w	22	71	w
6	35	m	23	77	m
7	25	w	24	56	w
8	51	w	25	74	m
9	37	m	26	78	w
10	22	w	27	64	m
11	29	w	28	66	w
12	32	m	29	80	w
13	31	m	30	59	m
14	32	w	31	25	w
15	34	w	32	34	w
16	33	w	33	72	m
17	30	w			

**Tabelle A 3: Legende zu Tabelle A1 und A2**

<b>Bezeichnung</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>8</b>	<b>9</b>
T	Cis	T1	T2	T3	T4		Tx	n.a.
N	N0	N1	N2a	N2b	N2c	N3	Nx	n.a.
G	G0	G1	G2	G3	G4		Gx	n.a.
R	R0	R1					Rx	n.a.

## Ergebnisse der Real-Time-PCR

**Tabelle A 4: Ergebnisse der relativen real-time PCR der Erkrankten**

<b>Nummer</b>	<b>ITG B6/ GAPDH</b>	<b>Nummer</b>	<b>ITG B6/ GAPDH</b>
1	2.23E+02	29	1.84E-01
2	1.17E-02	30	3.00E-01
3	9.63E-04	31	1.82E-01
4	5.77E-01	32	1.98E+01
5	1.26E+00	33	4.21E-01
6	5.04E-02	34	3.24E+00
7	3.17E-01	35	2.37E+02
8	3.89E-01	36	4.51E+00
9	2.56E+00	37	1.24E+00
10	6.99E+00	38	1.24E-01
11	4.00E+00	39	4.61E-02
12	1.59E-02	40	5.24E-01
13	0	41	1.69E+01
14	9.93E-04	42	1.98E+01
15	2.67E-01	43	5.73E+00
16	5.68E-02	44	2.29E+00
17	2.32E-01	45	1.60E+01
18	9.42E-02	46	4.10E+00
19	9.00E+01	47	1.24E-01
20	7.96E-03	48	5.25E-02
21	1.77E+00	49	5.57E-03
22	1.54E-01	50	3.73E-02
23	4.02E-01	51	3.12E-03
24	6.81E-03	52	6.35E-02
25	6.42E-01	53	1.47E-01
26	3.53E+00	54	5.50E-02
27	8.44E-02	55	6.86E-02
28	1.62E+01		

**Tabelle A 5: Ergebnisse der relativen real-time PCR der Gesunden**

<b>Nummer</b>	<b>ITG B6/ GAPDH</b>	<b>Nummer</b>	<b>ITG B6/ GAPDH</b>
1	9.57E-03	18	6.48E-04
2	2.50E-01	19	1.30E-04
3	1.20E-01	20	9.98E-04
4	1.79E-01	21	3.97E-02
5	1.61E+00	22	7.99E-05
6	2.43E-02	23	8.67E-01
7	5.53E-02	24	1.34E+00
8	3.84E-01	25	2.55E+00
9	2.87E-01	26	1.51E-01
10	8.03E-01	27	8.70E-02
11	1.13E+00	28	8.55E-03
12	8.81E-01	29	1.02E+01
13	1.63E-01	30	2.01E-04
14	1.22E-01	31	2.44E-03
15	2.04E-01	32	2.38E-02
16	3.53E-01	33	9.10E-02
17	9.34E-03		



## Danksagung

Herrn Prof. Dr. Dr. Andreas Kolk danke ich sehr für den wissenschaftlichen Austausch und die Überlassung des interessanten Dissertationsthemas.

Herrn PD Dr. Dr. Markus Nieberler danke ich herzlich für die ausgezeichnete Betreuung, die engagierte Hilfe bei der Durchführung der Arbeit, die kritische Durchsicht und Korrektur meiner Arbeit, die hilfreichen Anregungen, die ermutigenden Worte und die Motivation über all die Jahre.

Herrn Frederic Klein danke ich für die Unterstützung bei der statistischen Auswertung und die Beantwortung aller dies betreffender Fragen.

Zuletzt danke ich meiner Familie für die emotionale Unterstützung und den Rückhalt während meines Studiums und meiner Dissertation.

Mein außerordentlicher Dank gilt meinem Ehemann für sein Verständnis und die unvergleichliche, stets unermüdliche Motivation und Unterstützung und meinen drei Söhnen für den wertvollen Perspektivenwechsel während dieser Zeit.

## Veröffentlichung

Die im Rahmen dieser Dissertation entstandenen Ergebnisse wurden innerhalb einer Fachkonferenz präsentiert.

Vortrag im Rahmen der 70. Jahrestagung der Arbeitsgemeinschaft für Kieferchirurgie/ 41. Jahrestagung des Arbeitskreises für Oralpathologie und Oralmedizin 2022 in Bad Homburg, Deutschland, mit Teilergebnissen dieser Arbeit:

Klews, Anne-Kathrin; Wolff, Klaus-Dietrich; Nieberler Markus (2022) Liquid Biopsie aus Plasma für ein minimal-invasives Monitoring von Kopf-Hals-Karzinompatienten. Hauptthema 2 AKOPOM: Liquid Biopsy: ID 121