

# Καρκίνωμα γλώσσας από πλακώδες επιθήλιο και έκφραση των microRNAs

Κωνσταντίνος ΠΑΡΑΣΚΕΥΟΠΟΥΛΟΣ<sup>1</sup>, Παναγιώτα ΤΟΥΠΛΙΚΙΩΤΗ<sup>2</sup>, Κωνσταντίνος ΒΑΧΤΣΕΒΑΝΟΣ<sup>3</sup>, Γεώργιος ΚΟΛΟΥΤΣΟΣ<sup>4</sup>, Αλέξανδρος ΛΑΜΠΡΟΠΟΥΛΟΣ<sup>5</sup>, Κωνσταντίνος ΑΝΤΩΝΙΑΔΗΣ<sup>6</sup>, Κωνσταντίνος ΠΑΠΑΖΗΣΗΣ<sup>7</sup>

Κλινική Στοματικής και Γναθοπροσωπικής Χειρουργικής, Οδοντιατρική Σχολή ΑΠΘ (Διευθυντής: Καθηγητής Κ. Αντωνιάδης)

## Squamous cell carcinoma of the tongue and microRNAs expression

Konstantinos PARASKEVOPOULOS, Panagiota TOUPLIKIOTI, Konstantinos VAHTSEVANOS, George KOLOUTSOS, Alexandros LAMBROPOULOS, Konstantinos ANTONIADES, Konstantinos PAPAZISIS

Department of Oral and Maxillofacial Surgery, School of Dentistry, Aristotle University of Thessaloniki, Greece (Head: Professor K. Antoniadis)

Ερευνητική Εργασία  
Research Paper

**ΠΕΡΙΛΗΨΗ:** Τα microRNAs είναι μόρια τα οποία επηρεάζουν ποικίλες βιολογικές κυτταρικές λειτουργίες οδηγώντας σε κακοήθεις βλάβες, μεταξύ των οποίων και στον καρκίνο της γλώσσας από πλακώδες επιθήλιο. Σκοπός της συγκεκριμένης ερευνητικής εργασίας είναι να προσδιοριστεί η διαφορετική έκφραση των μορίων αυτών στον καρκίνο της γλώσσας από πλακώδες επιθήλιο σε σύγκριση με τον παρακείμενο φυσιολογικό ιστό.

**Υλικά και Μέθοδοι:** Συλλέξαμε δώδεκα δείγματα από τη βλάβη και τον παρακείμενο φυσιολογικό ιστό της γλώσσας. Χρησιμοποιήσαμε το miRNA real-time PCR array system για να προσδιορίσουμε την miRNA έκφραση του καρκινώματος της γλώσσας από πλακώδες επιθήλιο.

**Αποτελέσματα και Συμπεράσματα:** Ανακαλύψαμε την απορρύθμιση μερικών miRNAs που θα μπορούσε να αλλάξει την πρόγνωση. MiR-196a, miR-142, miR-96 και miR-21 ήταν αυτά με τη μεγαλύτερη αύξηση στην έκφραση, ενώ η έκφραση των miR-133, miR-206 και miR-1 ήταν σημαντικά μειωμένα. Τα γονίδια-στόχος των μορίων αυτών ελέγχουν τα μονοπάτια που ρυθμίζουν την κυτταρική επιβίωση, τον πολλαπλασιασμό, την διαφοροποίηση, μετανάστευση, διήθηση, την απόπτωση και το μεταβολισμό. Είναι όμως σημαντικό να ελεγχθεί περαιτέρω ο ρόλος τους.

**ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ:** Καρκίνωμα γλώσσας από πλακώδες επιθήλιο, ανθρώπινο γονιδίωμα, microRNAs, ρύθμιση, γονίδια-στόχοι, μονοπάτια.

**SUMMARY:** MicroRNAs are involved in regulating diverse cellular biological processes leading to malignancies, including tongue squamous cell carcinoma (TSCC). There are only few published data on the miRNAs that are expressed in the squamous cell carcinoma of the tongue. The purpose of this study is to identify the differential miRNA expression between squamous cell carcinoma of the tongue and the adjacent normal tissues.

**Material and methods:** We have collected twelve samples from the tumor and the healthy adjacent tissue of the tongue. We used miRNA real-time PCR array system to identify miRNA expression profiles of squamous cell carcinoma of the tongue.

**Results and conclusions:** We identified some deregulated miRNAs which may contribute to different prognosis. MiR-196a, miR-142, miR-96 and miR-21 were the ones with the highest upregulation, whilst the expression of miR-133, miR-206 and miR-1 was significantly suppressed. The target genes control pathways that regulate cell survival, proliferation, differentiation, migration, invasion, apoptosis and metabolism. It is therefore important to further explore their roles in the carcinogenesis and treatment of TSCC.

**KEY WORDS:** Tongue squamous cell carcinoma; human genome; microRNAs; regulation; target genes; pathways.

<sup>1</sup> Δρ ΣΠΧ, Επιμελήτης, Κλινική ΣΠΧ, ΓΝΘ «Γ. Παπανικολάου»

<sup>2</sup> Δρ, Επιμελήτρια, Κυτταρολογικό Τμήμα, ΑΝΘ «Θεαγένειο»

<sup>3</sup> Δρ ΣΠΧ, Αναπλ. Καθηγήτης, Κλινική ΣΠΧ, ΓΝΘ «Γ. Παπανικολάου»

<sup>4</sup> Δρ ΣΠΧ, Επιστημονικός συνεργάτης, Κλινική ΣΠΧ, ΓΝΘ «Γ. Παπανικολάου»

<sup>5</sup> Δρ, Καθηγητής, Διευθυντής, Εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας, Α΄ Γυναικολογική και Μαιευτική Κλινική, ΓΝΘ «Παπαγεωργίου»

<sup>6</sup> Δρ ΣΠΧ, Καθηγητής, Διευθυντής, Κλινική ΣΠΧ, ΓΝΘ «Γ. Παπανικολάου»

<sup>7</sup> Δρ, Διευθυντής, Ογκολογικό Τμήμα, Γενική Κλινική Θεσσαλονίκης «Euromedica»

## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Το καρκίνωμα της γλώσσας από πλακώδες επιθήλιο (TSCC) είναι ο πιο συχνός τύπος του καρκίνου του στόματος από πλακώδες επιθήλιο (OSCC) και αποτελεί την έκτη πιο συχνή μορφή συμπαγούς καρκίνου παγκοσμίως (Parkin και συν. 2005, Jemal και συν. 2007). Ο TSCC είναι μια επιθετική μορφή κακοήθειας με γρήγορη τοπική διήθηση και διασπορά (Franceschi και συν. 1993, Polanska και συν. 2014). Προηγούμενες μελέτες απέδειξαν ότι τα καρκινώματα της γλώσσας βιολογικά και επιδημιολογικά διαφέρουν από τις άλλες εντοπίσεις στη στοματική κοιλότητα. Η κατανόηση του γονιδιακού δικτύου και της microRNA ρύθμισης θα ήταν πολύ βοηθητική στην βελτίωση της πρόληψης, διάγνωσης και θεραπείας της νόσου. Τα microRNAs είναι μικρά σε μέγεθος (18-24 νουκλεοτίδια) ενδογενή μόρια RNA μονής έλικας. Πρωτοανακαλύφθηκαν το 1993, μέσω της παρατήρησης ότι μόριο RNA με 22 νουκλεοτίδια είναι απαραίτητο για το σωστό συγχρονισμό της μετεμβρυικής ανάπτυξης της *Caenorhabditis elegans* (Fire και συν. 1998, Ni και συν. 2014). Τα microRNAs επηρεάζουν πολλές και διάφορες κυτταρικές λειτουργίες μέσω καταστολής της μεταγραφής και/ή αναστολής της μετάφρασης ενός μεγάλου αριθμού γονιδίων κατά τη διάρκεια της φυσιολογικής ανάπτυξης και παθολογικών αποκρίσεων (Brandi και συν. 2010). Μέχρι σήμερα πάνω από 1000 miRNAs έχουν καταγραφεί. Οι ερευνητές πιστεύουν ότι αυτά ρυθμίζουν πάνω από το 50% των ανθρώπινων γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες. Κάθε miRNA έχει τη δυνατότητα να ρυθμίζει πολλά γονίδια-στόχους. Έχει φανεί ότι η miRNA έκφραση μεταβάλλεται σε πολλές παθολογικές καταστάσεις, όπως ο καρκίνος (Garzon και συν. 2009). Ο καρκίνος της γλώσσας από πλακώδες επιθήλιο δίνει συχνά μεταστάσεις και είναι ιδιαίτερα διηθητικός. Προκειμένου να βελτιωθεί η επιβίωση των ασθενών, θα πρέπει να επιτευχθεί μία καλύτερη κατανόηση της συμπεριφοράς του όγκου, κάτι που θα μπορούσε να διευκολύνει την πρόωμη διάγνωση του καρκίνου. Όπως και σε άλλες μορφές καρκίνου, έτσι και σε αυτόν της γλώσσας συμβαίνουν πολυεπίπεδες και δυναμικές μεταβολές στο γονιδίωμα. Ωστόσο, μέχρι τώρα, η έρευνα στον καρκίνο της γλώσσας εντοπίζεται κυρίως στα γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες, με αποτέλεσμα οι γνώσεις μας όσον αφορά τις μεταβολές των γονιδίων που δεν κωδικοποιούν πρωτεΐνες να είναι περιορισμένες. Σκοπός της έρευνάς μας είναι να προσδιορίσουμε τη διαφοροποίηση της έκφρασης των miRNAs μεταξύ του καρκίνου της γλώσσας από πλακώδες επιθήλιο και των παρακείμενων φυσιολογικών ιστών.

## ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

*Δείγματα ασθενών.* Συνελέγησαν ζεύγη δειγμάτων από καρκίνο του σώματος της γλώσσας και παρακείμενου φυσιολογικού ιστού από 12 ασθενείς, οι οποίοι εμφανί-

## INTRODUCTION

Squamous cell carcinoma of the tongue (TSCC) is the most frequent type of oral squamous cell carcinoma (OSCC), and represents the sixth most frequent solid cancer around the world (Parkin et al 2005, Jemal et al 2007). TSCC is an aggressive malignancy with a propensity for rapid local invasion and metastatic spread (Franceschi et al 1993, Polanska et al 2014). Previous studies have demonstrated that cancers of the tongue are biologically and epidemiologically distinct from other tumors of the oral cavity. The understanding of gene network and microRNA regulation would be helpful in improving prevention, diagnosis and therapy of the disease. MicroRNAs are a group of endogenous, non-coding, 18-24 nucleotide length single-strand RNA molecules. They were first identified, in 1993, through the observation that a 22-nucleotide RNA is required for the appropriate timing of post-embryonic development of *Caenorhabditis elegans* (Fire et al 1998, Ni et al 2014). MicroRNAs influence many diverse biological functions through the repression of the transcription and/or inhibition of the translation of a large number of genes during normal development and pathological responses (Brandi et al 2010). To date, over 1000 miRNAs have been recorded. The investigators believe that they regulate more than 50% of human protein coding genes. Each miRNA has the potential to regulate many target genes. It has been shown that miRNA expression profiles change in several pathological conditions, such as cancer (Garzon et al 2009). Tongue squamous cell carcinoma (TSCC) exhibits frequent invasion and metastasis. In order to improve patients' survival, a better understanding of tumor behavior is required. This could make possible the early detection of aggressive tumors. In TSCC, as in other human cancers, multi-step dynamic changes in the genome occur. However, since now, the investigation on TSCC has mainly focused on protein-coding genes, so that our knowledge on the alterations of the non-protein coding genes in TSCC is limited. The purpose of this study is to identify the differential miRNA expression between squamous cell carcinoma of the tongue and the adjacent normal tissues.

## MATERIALS AND METHODS

*Patient samples.* Pairs of primary tongue carcinomas located at the anterior (body) of the tongue and adjacent normal tissues were obtained from 12 patients, who were admitted to the Department of Oral and Maxillofacial Surgery of the "Theagenion" Cancer Hospital and the "G. Papanikolaou" General Hospital of Thessaloniki between April 2010 and May 2011. None of the patients of our study received radiotherapy or chemotherapy or any other treatment before the operation. Before tissue collection, all patients signed the written consent of tissue

στηκαν στην Στοματική και Γναθοπροσωπική Χειρουργική Κλινική του ΑΝΘ «Θεαγένειο» και του ΓΝΘ «Γ. Παπανικολάου» μεταξύ Απριλίου του 2010 και Μαΐου του 2011. Κανένας από τους ασθενείς αυτούς δεν έλαβε ακτινοθεραπεία ή χημειοθεραπεία ή οποιαδήποτε άλλη θεραπεία προεγχειρητικά. Πριν τη συλλογή των δειγμάτων όλοι οι ασθενείς υπέγραψαν έγγραφη συγκατάθεση δωρεάς ιστών για ερευνητικούς λόγους. Το πρωτόκολλο εγκρίθηκε από την Επιτροπή Ηθικής του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης, Ελλάδα.

**Συλλογή και ομογενοποίηση των δειγμάτων.** Τα δείγματα που ελήφθησαν καταψύχθηκαν σε RNA-later για 24 ώρες στους 4-8°C και αποθηκεύτηκαν στους -80°C μέχρι την ομογενοποίηση.

**Εξαγωγή RNA.** Η απομόνωση του RNA έγινε σύμφωνα με το πρωτόκολλο του miRNEasy Mini Kit της Qiagen. Ο σχηματισμός cDNA από ώριμα miRNAs έγινε σύμφωνα με το πρωτόκολλο του miScript II RT kit του miScript PCR System της Qiagen χρησιμοποιώντας Reverse Transcriptase PCR.

**qREAL Time PCR.** qReal Time PCR για τα miRNAs διενεργήθηκε χρησιμοποιώντας miScript miRNA PCR Arrays (MIHS-102ZC, Qiagen) και miScript SYBR Green PCR kit και Real Time PCR ABI 7500 fast machine. Οι συνθήκες της αντίδρασης ήταν 95°C για 15 λεπτά, ακολουθούμενες από 40 κύκλους PCR στους 94°C για 15 δευτερόλεπτα, 55°C για 30 δευτερόλεπτα και 70°C για 34 δευτερόλεπτα. Ακολούθησε η melting curve ανάλυση.

**qReal Time PCR ανάλυση για τα miRNAs.** Η ανάλυση των αποτελεσμάτων διενεργήθηκε σύμφωνα με το διαδικτυακό πρόγραμμα miScript miRNA PCR Array Data Analysis της SABiosciences, το οποίο βασίζεται στην ποσοτική μέθοδο  $2^{-\Delta\Delta C}$ , με γονίδια αναφοράς τα SN1 (SNORD61), SN2 (SNORD68), SN4 (SNORD95), SN5 (SNORD96A) (miScript PCR Controls for Normalization).

## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

MiRNA microarray έγινε σε 12 ζεύγη δειγμάτων καρκίνου γλώσσας από πλακώδες επιθήλιο σε αντιπαράθεση με τους αντίστοιχους παρακείμενους φυσιολογικούς ιστούς, με σκοπό να αναλύσουμε την διαφορετική έκφραση των ώριμων miRNAs (Πίνακας 1). Το δείγμα 9Ca 9N δεν το συμπεριλάβαμε στην ανάλυση γιατί δεν πληρούσε την προϋπόθεση: mean miRTC (RT Control) - mean PPC (PCR Control)  $\leq 7$ . Σημαντική διαφορά στην έκφραση παρατηρήθηκε σε 29 miRNAs μεταξύ φυσιολογικού και παθολογικού ιστού. Χρησιμοποιώντας τον διπλασιασμό της έκφρασης ως όριο, προσδιορίσαμε 23 miRNAs με υπερέκφραση και 6 με χαμηλότερη έκφραση (Πίνακες 2 και 3). Μπορούμε να παρατηρήσουμε ότι υπάρχουν ορισμένα miRNAs που εμφανίζουν αξιοσημείωτη υπερέκφραση στα καρκινικά κύτταρα σε σχέση με τα φυσιολογικά, όπως 196a-5p (37,45), 142-5p (5,94), 96-5p (6,14), 21-5p (5,46), 301a-3p (7,22), 7-5p (4,02)

donation for research purposes. The protocol was approved by the Ethics Committee of Aristotle University of Thessaloniki, Greece.

**Collection and homogenization of the samples.** Surgical specimens of the resected tumors were collected, and lumps of tumors as well as adjacent normal tissues, were frozen in RNA-later for 24 hours at 4-8°C and stored at -80°C until homogenization.

**RNA extraction.** Isolation of the RNA was performed according to the protocol of miRNEasy Mini Kit of Qiagen. The formation of cDNA of mature miRNAs was performed according to the protocol of miScript II RT kit of miScript PCR System of Qiagen using Reverse Transcriptase PCR.

**qREAL Time PCR.** qReal Time PCR for miRNAs was performed using miScript miRNA PCR Arrays (MIHS-102ZC, Qiagen) and miScript SYBR Green PCR kit and Real Time PCR ABI 7500 fast machine. The reaction conditions were 95°C for 15 min, followed by 40 cycles of PCR at 94°C for 15 sec, 55°C for 30 sec and 70°C for 34 sec. Then melting curve analysis was done.

**qReal Time PCR analysis for miRNAs.** Result analysis was performed according to the online program miScript miRNA PCR Array Data Analysis of SABiosciences which is based on quantitative method  $2^{-\Delta\Delta C}$ , using reference genes SN1 (SNORD61), SN2 (SNORD68), SN4 (SNORD95), SN5 (SNORD96A) (miScript PCR Controls for Normalization).

## RESULTS

MiRNA microarray was done in 12 paired samples of TSCC versus matched tongue tissues, in order to analyze differential expression of mature miRNAs (Table 1). Sample 9Ca 9N was not included in the analysis because it did not fulfill the requirement: mean miRTC (RT Control) - mean PPC (PCR Control)  $\leq 7$ . A marked difference in expression was observed in 29 miRNAs between TSCC and normal tongue tissues. Using 2-fold expression difference as a cutoff level, we identified 23 up-regulated miRNAs and 6 down-regulated (Tables 2, 3). We can observe from the results that there are some miRNAs that show a remarkable overexpression in tumor cells compared to matched normal cells such as 196a-5p (37,45), 142-5p (5,94), 96-5p (6,14), 21-5p (5,46), 301a-3p (7,22), 7-5p (4,02) and 18a-5p (4,7). On the other side 5 miRNAs were significantly under expressed in tumor cells. These miRNAs are 133b (-6,82), 122-5p (-4,25), 378-3p (-4,21), 206 (-13,69), 1 (-28,29).

Table 1 shows clinicopathological variables including gender, age, T-stage, survival and recurrence. Tables 2 and 3 show the list of genes that are upregulated or down-regulated in tongue cancer according to our data as well as the magnitude of the fold regulation. Median overall

και 18a-5p (4,7). Από την άλλη, 5 miRNAs είχαν σημαντικά μειωμένη έκφραση στα καρκινικά κύτταρα. Αυτά είναι τα 133b (-6,82), 122-5p (-4,25), 378-3p (-4,21), 206 (-13,69), 1 (-28,29).

Στον Πίνακα 1 εμφανίζονται κλινικοπαθολογικές μεταβλητές συμπεριλαμβανομένων του φύλου, της ηλικίας, του σταδίου T, της επιβίωσης και της υποτροπής. Στους Πίνακες 2 και 3 φαίνεται η λίστα των γονιδίων με υπερέκφραση και μειωμένη έκφραση στον καρκίνο της γλώσσας σύμφωνα με τα δεδομένα μας, όπως και το μέγεθος της ρύθμισης. Ο μέσος όρος επιβίωσης των ασθενών ήταν 42,25 μήνες (Kaplan-Meyer) όπως φαίνεται στην Εικόνα 1.

Μπορούμε να παρατηρήσουμε στο clustergram (Εικόνα 2) ότι στην ασθενή «6» εμφανίστηκε πολύ διαφορετική έκφραση miRNA μεταξύ καρκινικών και φυσιολογικών κυττάρων. Η ασθενής επιβίωσε μόνο για 5 μήνες μετά το χειρουργείο. Η ασθενής «4» είχε υπερέκφραση διαφόρων miRNAs στα κύτταρα του καρκίνου. Οι ασθενείς «5» και «20», οι οποίοι είχαν χαμηλή επιβίωση, δεν εμφάνισαν ιδιαίτερη διαφορά στην έκφραση. Ο ασθενής, όμως, «12» ενώ είχε μια εντελώς διαφορετική miRNA έκφραση μεταξύ παθολογικών και φυσιολογικών κυττάρων, παραμένει εν ζωή χωρίς υποτροπή ή μετάσταση. Ωστόσο, με δεδομένο τον μικρό αριθμό ασθενών της μελέτης είναι δύσκολο να εξαγάγουμε στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα για την επίδραση συγκεκριμένης miRNA έκφρασης στην επιβίωση.

## ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Τα miRNAs φαίνεται ότι ελέγχουν την έκφραση περισσότερων από το ένα τρίτο των γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες στο ανθρώπινο γονιδίωμα. Η ρύθμιση συμβαίνει σε μεταμεταγραφικό επίπεδο μέσω σύνδεσης σε συγκεκριμένες αλληλουχίες στο mRNA στόχο βασισμένη στην «ατελή συμπληρωματικότητα». Λόγω αυτού, κάθε μόριο miRNA δυναμικά μπορεί να ρυθμίζει εκατοντάδες γονίδια. Επομένως, μετατροπή των miRNAs αναμένεται σε ασθένειες, όπως ο καρκίνος, οι οποίες σχετίζονται με διαταραγμένη γονιδιακή έκφραση. Έχει προταθεί ότι η miRNA μεταβολή θα μπορούσε να προκαλέσει καρκινογένεση. Είναι περιορισμένες οι πληροφορίες σχετικά με την διαταραγμένη έκφραση των miRNAs στον καρκίνο της γλώσσας από πλακώδες επιθήλιο. Μετά τον έλεγχο 96 miRNAs στον καρκίνο της γλώσσας και τον παρακείμενο φυσιολογικό ιστό, προσδιορίσαμε μία ομάδα miRNAs με διαταραγμένη έκφραση. Αρκετά miRNAs στη μελέτη μας εμφάνισαν υψηλή ή χαμηλή έκφραση (Πίνακες 2 και 3). Θα αποφύγουμε να αναλύσουμε ολόκληρη τη λίστα, αλλά θα εστιάσουμε σε αυτά που είχαν περισσότερες από 5 φορές διαφορά στην έκφραση, καθώς είναι πιο πιθανό να είναι πιο σημαντικά για τη συγκεκριμένη κακοήθεια.

## Πίνακας 1

Κλινικοπαθολογικές μεταβλητές

Δείγμα	Φύλο	Ηλικία	T-στάδιο	Επιβίωση	Υποτροπή
4	Θήλυ	53	T1	25 μήνες	14 μήνες
5	Άρρεν	37	T2	24 μήνες	10 μήνες
6	Θήλυ	72	T2	5 μήνες	3 μήνες
9	Θήλυ	57	T2	Εν ζωή	35 μήνες
10	Θήλυ	64	T2	5 μήνες	Όχι
12	Άρρεν	59	T2	Εν ζωή	Όχι
16	Θήλυ	64	T1	Εν ζωή	Όχι
17	Άρρεν	47	T1	Εν ζωή	Όχι
20	Άρρεν	77	T2	2 μήνες	Όχι
22	Θήλυ	50	T1	Εν ζωή	27 μήνες
26	Θήλυ	54	T1	36 μήνες	27 μήνες
29	Θήλυ	71	T2	Εν ζωή	Όχι

Table 1

Clinicopathological variables

Sample	Gender	Age	T-stage	Survival	Recurrence
4	Female	53	T1	25 months	14 months
5	Male	37	T2	24 months	10 months
6	Female	72	T2	5 months	3 months
9	Female	57	T2	Alive	35 months
10	Female	64	T2	5 months	No
12	Male	59	T2	Alive	No
16	Female	64	T1	Alive	No
17	Male	47	T1	Alive	No
20	Male	77	T2	2 months	No
22	Female	50	T1	Alive	27 months
26	Female	54	T1	36 months	27 months
29	Female	71	T2	Alive	No

survival for the population was 42.25 months (Kaplan-Meyer) as is shown in Figure 1.

We can observe by clustergram (Figure 2) that patient "6" had a very different miRNA expression between tumor and normal cells; she survived only for 5 months after surgery. Patient "4" had an overexpression of different miRNAs in tumor cells in comparison with matched normal cells. Patients "5" and "20" who did not survive for a long time showed no remarkable difference in miRNA expression. On the other hand patient "12" had a completely different miRNA expression between tumor and normal cells, but is still alive without recurrence or metastasis. However, as the population of the study is relatively small, it is difficult to draw statistical significant conclusion for the effect of specific miRNA expressions on survival.

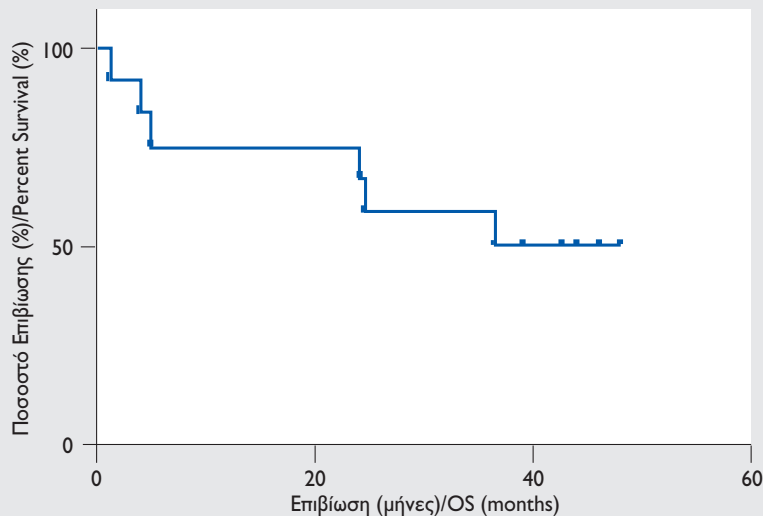
## DISCUSSION

MiRNAs seem to control the expression of more than



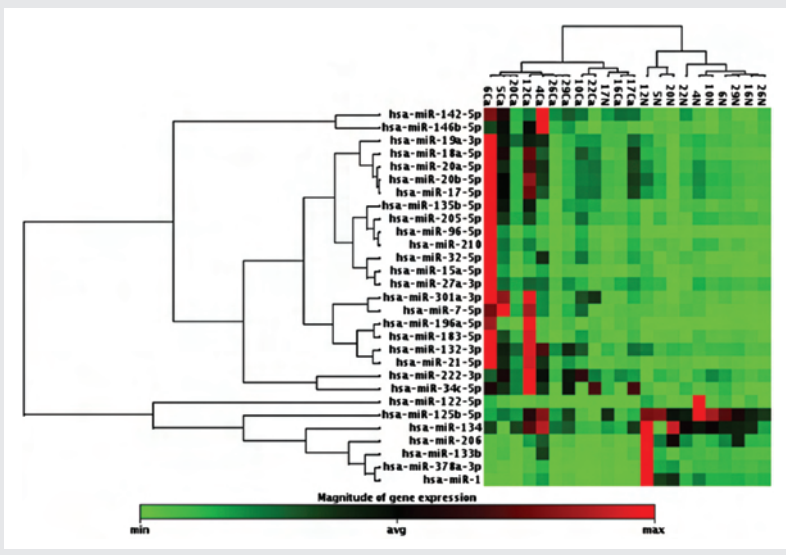
**Εικόνα 1/Figure 1**

Συνολική επιβίωση ασθενών μελέτης. Μέσος όρος επιβίωσης 42,25 μήνες.  
Overall survival for the study population. Median OS was 42.25 months.

**Εικόνα 2/Figure 2**

Clustergram των miRNAs που υπο- και υπερεκφράστηκαν στον καρκινικό ιστό σε σχέση με τον παρακείμενο φυσιολογικό ιστό.

Clustergram of miRNAs that were under and overexpressed in cancer samples vs adjacent normal tissues.

**Micro-RNAs με υπερέκφραση στον καρκίνο της γλώσσας**

Το miR-196a είναι αντιαποπτωτικός παράγοντας και παίζει κρίσιμο ρόλο στην γονιδιακή ρύθμιση, την αρχιτεκτονική του πυρήνα και τη δέσμευση ασβεστίου. Στοιχεί την annexin-A1, έναν μεσολαβητή της απόπτωσης και αναστολέα του κυτταρικού πολλαπλασιασμού (Luthra και συν. 2008), το HOXB8 και HMGA2 και συσχετίζεται ισχυρά

one-third of the protein-coding genes in the human genome. The regulation occurs at post-transcriptional level by binding to specific sequences in the target mRNA molecules based on 'imperfect complementarity'. Because of this each miRNA can potentially regulate hundreds of genes. Thus, miRNA alteration is expected to be found in diseases, such as cancers, which are ascribed to dysregulated gene expression. It has been suggested that miRNA alteration could initiate carcinogenesis. There is limited information on aberrantly expressed miRNAs in tongue SCC. After screening 96 miRNAs in tumor and normal cells, we identified a panel of aberrantly expressed miRNAs. Several miRNAs have been shown in our study to be up- or down-regulated in tongue cancer as compared to adjacent normal tissue (tables 2 and 3). We will avoid discussing the entire list but we will emphasize the ones with more than a 5-fold difference in expression, as they are ones more likely to be important for the specific malignancy.

**Micro-RNAs up-regulated in tongue cancer**

MiR-196a is an antiapoptotic agent and performs critical roles such as gene regulation, nuclear architecture and calcium binding. It targets annexin-A1, a mediator of apoptosis and inhibitor of cell proliferation (Luthra et al 2008), HOXB8 and HMGA2, and it has strongly been associated with several cancers (Chen et al 2011). In the present study MiR-196a was highly overexpressed underlining some important role in the pathogenesis of tongue cancer, probably through its antiapoptotic effects. Further studies are needed to explore the role of MiR-196a deregulation in this malignancy.

It has been suggested in previous studies that miR-142-5p is involved in many pathways of cancer, such as cell cycle, focal adhesion, MAPK, transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ), Wnt, vascular endothelial growth factor (VEGF), and notch pathway (Zhang X et al 2011). As it is regulating cell-cycle genes in squamous lung cancer (Su et al 2013), it may be involved in the same way in tongue cancer. Our results are in concert with those studies, showing a 6-fold overexpression of miR-142-5p in tongue cancer compared to normal tissue.

MiR-96 is targeting the forkhead box protein O1 (FOXO1), an important tumor-suppressor that is involved in the regulation of cellular proliferation, differentiation, cell cycle progression and apoptosis (Zhang Y et al 2011, Santhi et al 2013). It has been linked to several cancers, as bladder (Guo et al 2012), prostate (Hafli-dadóttir et al 2013), breast (Zhang J et al 2014) and colorectal cancer (Ress et al 2015). In our dataset, miR-96 was the second most highly upregulated micro-RNA, emphasizing its importance in the pathogenesis of oral cavity cancers as well. To our knowledge, this is the first report on that, which links miR-96 with tongue cancer.

με διάφορες μορφές καρκίνου (Chen και συν. 2011). Στη μελέτη μας το miR-196a είχε μια πολύ υψηλή έκφραση υποδεικνύοντας κάποιο σημαντικό ρόλο στην παθογένεση του καρκίνου της γλώσσας, πιθανότατα μέσω της αντιαποπτωτικής του δράσης. Περαιτέρω έρευνα είναι αναγκαία για να διευκρινιστεί ο ρόλος του σε αυτή τη νόσο. Σε προηγούμενες μελέτες είχε προταθεί ότι το miR-142-5p εμπλέκεται σε πολλά καρκινικά μονοπάτια όπως ο κυτταρικός κύκλος, η εστιακή προσκόλληση, MAPK, ο αυξητικός παράγοντας μετασχηματισμού-β (TGF-β), Wnt, αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας (VEGF) και μονοπάτι notch (Zhang X και συν. 2011). Καθώς ρυθμίζει τα γονίδια του κυτταρικού κύκλου στον καρκίνο του πνεύμονα από πλακώδη κύτταρα (Su και συν. 2013), θα μπορούσε να εμπλέκεται με τον ίδιο τρόπο και στον καρκίνο της γλώσσας. Τα αποτελέσματά μας είναι σε συμφωνία με τις συγκεκριμένες μελέτες, δείχνοντας μία αύξηση της έκφρασης κατά 6 φορές του miR-142-5p στον καρκίνο της γλώσσας σε σύγκριση με τον φυσιολογικό ιστό.

Το MiR-96 έχει ως στόχο την forkhead box protein O1 (FOXO1), έναν σημαντικό ογκοκαταστολέα που παίζει ρόλο στη ρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, της διαφοροποίησης, την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου και την απόπτωση (Zhang Y και συν. 2011, Santhi και συν. 2013). Έχει εντοπιστεί σε πολλές μορφές καρκίνου όπως της ουροδόχου κύστεως (Guo και συν. 2012), του προστάτη (Hafliadóttir και συν. 2013), του μαστού (Zhang J και συν. 2014) και του παχέος εντέρου (Ress και συν. 2015). Στα δικά μας αποτελέσματα το miR-96 ήταν το δεύτερο με την υψηλότερη έκφραση δίνοντας έμφαση στη σημασία του στην παθογένεση του καρκίνου της στοματικής κοιλότητας. Σύμφωνα με τα έως τώρα δεδομένα, είναι η πρώτη αναφορά εμπλοκής του miR-96 στον καρκίνο της γλώσσας.

Το miR-21 είναι αντιαποπτωτικός παράγοντας και στοχεύει ογκοκατασταλτικά γονίδια, TPM1 (tropomyosin 1) και PTEN (phosphatase and tensin homolog) (Zhang JG και συν. 2010). Προηγούμενες αναφορές έδειξαν ότι το miR-21 υπερεκφράζεται σε πολλούς άλλους συμπαγείς όγκους και σχετίζεται με την εξάπλωση του καρκίνου. Αύξηση του miR-21 συμβάλλει στην ανάπτυξη του γλοιοβλαστώματος (Chan JA και συν. 2005) και του ηπατοκυτταρικού καρκίνου (Meng και συν. 2007). Επιπρόσθετα, προάγει την ογκογένεση στο μαστό μέσω ενεργοποίησης του Bcl-2 (Si ML και συν. 2007) και σχετίζεται με αυξημένο στάδιο καρκίνου, λεμφαδενικές μεταστάσεις και πτωχή πρόγνωση στον καρκίνο του μαστού (Yan και συν. 2008). Το miR-21 θα μπορούσε να αποτελέσει έναν μελλοντικό βιοδείκτη για τον πρωτοπαθή καρκίνο του μαστού (Si H και συν. 2013). Επίσης, υπερέκφραση του miR-21 στον κολικό καρκίνο υποδηλώνει πτωχή επιβίωση και θεραπευτικό αποτέλεσμα (Schetter και συν. 2008). Ακόμη, το miR-21 έχει προταθεί ως ανεξάρτητος προγνωστικός πα-

## Πίνακας 2/Table 2

Γονίδια που υπερεκφράστηκαν στον καρκίνο της γλώσσας (TSCC)

Genes Over-Expressed in SCC of tongue

Θέση/ Position	Ωριμα ID/ Mature ID	Μέγεθος Ρύθμισης/ Fold Regulation
A04	hsa-miR-20b-5p	2,319
A06	hsa-miR-196a-5p	37,4475
A08	hsa-miR-142-5p	5,9427
A09	hsa-miR-96-5p	6,1369
A10	hsa-miR-222-3p	2,7501
B03	hsa-miR-15a-5p	2,6233
B06	hsa-miR-205-5p	3,1396
B10	hsa-miR-20a-5p	2,5727
B11	hsa-miR-146b-5p	2,9729
B12	hsa-miR-132-3p	2,4105
C02	hsa-miR-183-5p	3,0031
C03	hsa-miR-34c-5p	4,0695
C08	hsa-miR-138-5p	2,0005
D03	hsa-miR-135b-5p	3,8328
D06	hsa-miR-21-5p	5,4622
D08	hsa-miR-301a-3p	7,221
E05	hsa-miR-7-5p	4,0167
F04	hsa-miR-210	2,2712
F05	hsa-miR-17-5p	2,535
G01	hsa-miR-19a-3p	3,708
G03	hsa-miR-18a-5p	4,7018
G06	hsa-miR-27a-3p	2,1665
G11	hsa-miR-32-5p	3,5008

## Πίνακας 3/Table 3

Γονίδια που υπο-εκφράστηκαν στον καρκίνο της γλώσσας (TSCC)

Genes Under-Expressed in SCC of tongue

Θέση/ Position	Ωριμα ID/ Mature ID	Μέγεθος Ρύθμισης/ Fold Regulation
A02	hsa-miR-133b	-6,8216
A03	hsa-miR-122-5p	-4,2532
B04	hsa-miR-378a-3p	-4,2135
D04	hsa-miR-206	-13,6859
E01	hsa-miR-1	-28,2923
G04	hsa-miR-125b-5p	-2,6468

MiR-21 is an antiapoptotic factor and targets tumor-suppressing genes, TPM1 (tropomyosin 1) and PTEN (phosphatase and tensin homolog) (Zhang JG et al 2010). Previous reports have shown that miR-21 is overexpressed in many other solid tumors, and is related to tumor progression. Increased miR-21 contributes to the development of glioblastomas (Chan JA et al 2005) and hepatocellular carcinomas (Meng et al 2007). Furthermore, miR-21 promotes breast tumori-

ράγοντας και δείκτης πτωχής πρόγνωσης στον καρκίνο της γλώσσας από πλακώδες επιθήλιο (Jinsong Li και συν. 2009). Σύμφωνα με τα αποτελέσματά μας το miR-21 αυξήθηκε κατά 5,4 φορές σε σχέση με τον φυσιολογικό ιστό, κάτι που συνηγορεί στο ότι κατά πάσα πιθανότητα παίζει κρίσιμο ρόλο σε διάφορες μορφές καρκίνου και στο ότι θα μπορούσε να αποτελέσει έναν θεραπευτικό στόχο.

### Micro-RNAs με χαμηλή έκφραση στον καρκίνο της γλώσσας

Ένα από τα miRNAs που υποεκφράστηκαν στην έρευνά μας είναι το miR-133b. Έχει χαρακτηριστεί ως ογκοκατασταλτικό miRNA, καθώς αναστέλλει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, τη μετανάστευση και τη διήθηση στοχεύοντας τον EGFR στον προστάτη (Tao και συν. 2012) και στο ουροθηλιακό καρκίνωμα (Zhou και συν. 2013) και το μονοπάτι cdc42-PAK στον καρκίνο του στομάχου (Cheng και συν. 2014). Στη μελέτη μας υποεκφράζεται έντονα (6,8 φορές σε σχέση με τον φυσιολογικό ιστό) και θα μπορούσε να παίζει σημαντικό ρόλο στην παθογένεση και να αποτελέσει θεραπευτικό εργαλείο (Yu H και συν. 2014).

Τα miR-206 and miR-1 εμπλέκονται στο μονοπάτι pentose phosphate (PPP) και στον κύκλο tricarboxylic acid (TCA), επαναπρογραμματίζοντας το μεταβολισμό της γλυκόζης. Σύμφωνα με πρόσφατες έρευνες, τα miR-206 και miR-1 ρυθμίζονται με μεθυλίωση και ακετυλίωση στον καρκίνο και η έκφρασή τους είναι αντιστρόφως ανάλογη με την έκφραση του γονιδίου PPP (Singh και συν. 2013). Λαμβάνοντας υπόψιν ότι τα miR-206 και miR-1 καταστέλλονται ισχυρά στον καρκίνο της γλώσσας, την επίδρασή τους στο μονοπάτι PPP και την επακόλουθη μεταβολή στο μεταβολικό μονοπάτι, φαίνεται ότι είναι πολύ σημαντικά στην παθογένεση και θα μπορούσαν να αποτελέσουν θεραπευτικό στόχο αυτής της επιθετικής μορφής κακοήθειας.

Συμπερασματικά, προσδιορίσαμε πολλά miRNAs, των οποίων η έκφραση στον καρκίνο της γλώσσας απορρυθμίζεται και θα μπορούσαν να παίξουν σημαντικό ρόλο και στην παθογένεση, αλλά και στη θεραπεία της νόσου. Περαιτέρω έλεγχος της απορρύθμισης των miRNAs και διερεύνηση των πιθανών λειτουργικών ρόλων, θα ήταν πολύ βοηθητικός στην κατανόηση της παθογένεσης της νόσου, με απώτερο σκοπό τη χρήση του miRNA προφίλ για να προβλέψουμε την πρόγνωση των ασθενών με καρκίνο της γλώσσας από πλακώδες επιθήλιο.

genesis via Bcl-2 up-regulation (Si ML et al 2007), and correlates with advanced tumor staging, lymph node metastasis, and poor prognosis in breast cancers (Yan et al 2008). MiR-21 could act as a novel biomarker for primary breast cancer (Si H et al 2013). In addition, miR-21 overexpression in colon carcinomas indicates poor survival and poor therapeutic outcome (Schetter et al 2008). Furthermore, miR-21 is suggested to be an independent prognostic factor and a poor prognosis indicator in tongue squamous cell carcinomas (Jinsong Li et al 2009). We found that miR-21 was upregulated 5.4 times compared to normal tissue, adding to the observations that it plays crucial role in several cancers, and could become a possible therapeutic target.

### Micro-RNAs down-regulated in tongue cancer

One of the underexpressed miRNAs is miR-133b. It is reported as a tumor-suppressor miRNA as it inhibits cell proliferation, migration and invasion by targeting EGFR in prostate (Tao et al 2012) and urothelial cancer (Zhou et al 2013), and it targets the cdc42-PAK pathway in gastric cancer as well (Cheng et al 2014). It is strongly underexpressed in our study (x 6.8 times from normal tissue), and therefore it is probably important in pathogenesis and could be a potential tool for therapeutics (Yu H et al 2014).

MiR-206 and miR-1 are involved in the pentose phosphate pathway (PPP) and the tricarboxylic acid (TCA) cycle, reprogramming glucose metabolism. According to recent studies, miR-206 and miR-1 promoter is regulated by methylation and acetylation in cancer, and their expression is inversely correlated with PPP gene expression (Singh et al 2013). As the expression of both miR-206 and miR-1 is strongly suppressed in tongue cancer, their effect in regulating the pentose phosphate pathway and consequently altering the metabolic pathways, seems to be important in pathogenesis and could be a target for treatment in this highly aggressive malignancy.

In conclusion, we identified several miRNAs that are dysregulated in tongue cancer and may play an important role both in the pathogenesis and treatment of the disease. Further identification of dysregulated miRNAs and the clarification of their potential functional roles, would be helpful in understanding the pathogenesis of this disease, in order to use the miRNA expression profile to predict prognosis of the patients with TSCC.

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ/REFERENCES

- Brandi N, Davis-Dusenbery, Akiko Hata: MicroRNA in Cancer: The Involvement of Aberrant MicroRNA Biogenesis Regulatory Pathways. *Genes & Cancer* 1: 1100, 2010
- Chan JA, Krichevsky AM, Kosik KS: MicroRNA-21 is an antiapoptotic factor in human glioblastoma cells. *Cancer Res* 65(14):6029-33, 2005
- Chen C, Zhang Y, Zhang L, Weakley SM, Yao Q: MicroRNA-196: critical roles and clinical applications in development and cancer. *J Cell Mol Med* 15(1):14-23, 2011
- Cheng Z, Liu F, Wang G, Li Y, Zhang H, Li F: MiR-133 is a key negative regulator of CDC42-PAK pathway in gastric cancer. *Cell Signal* 26(12):2667-2673, 2014
- Fire A, Xu S, Montgomery M, Kostas SA, Driver SE, Mello CC: Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391(6669):806-11, 1998
- Franceschi D, Gupta R, Spiro RH, Shah JP: Improved survival in the treatment of squamous carcinoma of the oral tongue. *Am J Surg* 166:360-365, 1993
- Garzon R, Calin GA, Croce CM: MicroRNAs in Cancer. *Annu Rev Med* 60:167-79, 2009
- Guo Y, Liu H, Zhang H, Shang C, Song Y: MiR-96 regulates FOXO1-mediated cell apoptosis in bladder cancer. *Oncol Lett* 4(3):561-565, 2012
- Hafliadóttir BS, Lame O, Martin M, Persson M, Edsjö A, Bjartell A et al: Upregulation of miR-96 enhances cellular proliferation of prostate cancer cells through FOXO1. *PLoS One* 8(8):e72400, 2013
- Jemal A, Siegel R, Ward E, Murray T, Xu J, Thun MJ: Cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 57:43-66, 2007
- Jinsong Li, Hongzhang Huang, Lijuan Sun, Yang M, Pan C, Chen W et al: MiR-21 Indicates Poor Prognosis in Tongue Squamous Cell Carcinomas as an Apoptosis Inhibitor. *Clin Cancer Res* 15:3998-4008, 2009
- Luthra R, Singh RR, Luthra MG, Li YX, Hannah C, Romans AM et al: MicroRNA-196a targets annexin A1: a microRNA-mediated mechanism of annexin A1 downregulation in cancers. *Oncogene* 27(52):6667-78, 2008
- Meng F, Henson R, Wehbe-Janek H, Ghoshal K, Jacob ST, Patel T: MicroRNA-21 regulates expression of the PTEN tumor suppressor gene in human hepatocellular cancer. *Gastroenterology* 133(2):647-58, 2007
- Ni YH, Huang XF, Wang ZY, Han W, Deng RZ, Mou YB et al: Upregulation of a potential prognostic biomarker, miR-155, enhances cell proliferation in patients with oral squamous cell carcinoma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol* 117(2):227-33, 2014
- Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P: Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* 55:74-108, 2005
- Polanska H, Raudenska M, Gumulec J, Sztalmachova M, Adam V, Kizek R et al: Clinical significance of head and neck squamous cell cancer biomarkers. *Oral Oncol* 50(3):168-77, 2014
- Ress AL, Stiegelbauer V, Winter E, Schwarzenbacher D, Kiesslich T, Lax S et al: MiR-96-5p influences cellular growth and is associated with poor survival in colorectal cancer patients. *Mol Carcinog* 54(11):1442-50, 2015
- Santhi WS, Prathibha R, Charles S, Anurup KG, Reshmi G, Ramachandran S et al: Oncogenic microRNAs as biomarkers of oral tumorigenesis and minimal residual disease. *Oral Oncol* 49(6):567-75, 2013
- Schetter AJ, Leung SY, Sohn JJ, Zanetti KA, Bowman ED, Yanaihara N et al: MicroRNA expression profiles associated with prognosis and therapeutic outcome in colon adenocarcinoma. *JAMA* 299(4):425-36, 2008
- Si H, Sun X, Chen Y, Cao Y, Chen S, Wang Het al: Circulating microRNA-92a and microRNA-21 as novel minimally invasive biomarkers for primary breast cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 139(2):223-9, 2013
- Si ML, Zhu S, Wu H, Lu Z, Wu F, Mo YY: MiR-21-mediated tumor growth. *Oncogene* 26(19):2799-803, 2007
- Singh A, Happel C, Manna SK, Acquaah-Mensah G, Carrerero J, Kumar S et al: Transcription factor NRF2 regulates miR-1 and miR-206 to drive tumorigenesis. *J Clin Invest* 123(7):2921-34, 2013
- Su YH, Zhou Z, Yang KP, Wang XG, Zhu Y, Fa XE: MIR-142-5p and miR-9 may be involved in squamous lung cancer by regulating cell cycle related genes. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 17(23):3213-20, 2013
- Tao J, Wu D, Xu B, Qian W, Li P, Lu Q et al: MicroRNA-133 inhibits cell proliferation, migration and invasion in prostate cancer cells by targeting the epidermal growth factor receptor. *Oncol Rep* 27(6):1967-75, 2012
- Yan LX, Huang XF, Shao Q, Huang MY, Deng L, Wu QL et al: MicroRNA miR-21 overexpression in human breast cancer is associated with advanced clinical stage, lymph node metastasis and patient poor prognosis. *RNA* 14(11):2348-60, 2008
- Yu H, Lu Y, Li Z, Wang Q: MicroRNA-133: expression, function and therapeutic potential in muscle diseases and cancer. *Curr Drug Targets* 15(9):817-28, 2014
- Zhang J, Kong X, Li J, Luo Q, Li X, Shen L et al: MiR-96 promotes tumor proliferation and invasion by targeting RECK in breast cancer. *Oncol Rep* 31(3):1357-63, 2014
- Zhang JG, Wang JJ, Zhao F, Liu Q, Jiang K, Yang GH: MicroRNA-21 (miR-21) represses tumor suppressor PTEN and promotes growth and invasion in non-small cell lung cancer (NSCLC). *Clin Chim Acta* 411(11-12):846-52, 2010
- Zhang X, Z. Yan, J. Zhang, Gong L, Li W, Cui J et al: Combination of hsa-miR-375 and hsa-miR-142-5p as a predictor for recurrence risk in gastric cancer patients following surgical resection. *Annals of Oncology* 22: 2257-2266, 2011
- Zhang Y, Gan B, Liu D, Paik JH: FoxO family members in cancer. *Cancer Biol Ther* 12(4):253-9, 2011
- Zhou Y, Wu D, Tao J, Qu P, Zhou Z, Hou J: MicroRNA-133 inhibits cell proliferation, migration and invasion by targeting epidermal growth factor receptor and its downstream effector proteins in bladder cancer. *Scand J Urol* 47(5):423-32, 2013

Διεύθυνση επικοινωνίας:

**Κωνσταντίνος Παρασκευόπουλος**

ΓΝΘ «Γ. Παπανικολάου»,

Λεωφ. Παπανικολάου, Πυλαία-Χορτιάτης 570 10, Θεσσαλονίκη

Τηλ.: 2313307275, Fax: 2313307074

e-mail: kostparas@yahoo.gr

Address:

**Konstantinos Paraskevoopoulos**

"G. Papanikolaou" General Hospital of Thessaloniki,

Papanikolaou Av., Pylaia-Chortiatis 570 10, Thessaloniki, Greece

Tel: 0030 2313307275, Fax: 0030 2313307074

e-mail: kostparas@yahoo.gr