

Aus der Klinik für Radioonkologie und Strahlentherapie  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin  
Translationales Forschungslabor für Strahlenbiologie &  
Radioonkologie

DISSERTATION

Der Einfluss von MikroRNAs auf die Wirksamkeit der  
Radiochemotherapie des lokal fortgeschrittenen Kopf-  
Hals-Karzinoms

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor rerum medicinalium (Dr. rer. medic.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Anne-Katrin Heß

aus Frankfurt (Oder)

Datum der Promotion: 08.12.17

# Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung .....	2
Abstract .....	4
Eidesstattliche Versicherung .....	6
Anteilerklärung an den erfolgten Publikationen.....	7
Journal Summary List (ISI Web of Knowledge <sup>SM</sup> ).....	8
Ausgewählte Publikation.....	10
Curriculum Vitae .....	29
Publikationen .....	32
Danksagung .....	34

## Zusammenfassung

Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereiches (HNSCC – englisch: *head and neck squamous cell carcinoma*) umfassen Tumoren, die ihren Ursprung in der Mundhöhle, dem Pharynx, Larynx oder den Speicheldrüsen haben. Risikofaktoren sind die aktive und passive Exposition zu Tabakrauch, starker Alkoholabusus und eine Infektion mit humanen Papillomaviren (HPV).

Trotz der Fortschritte in der Behandlung von HNSCC ist die Standardtherapie für inoperable, lokal fortgeschrittene Tumoren weiterhin die Cisplatin-basierte Radiochemotherapie, die zu 5-Jahres-Überlebensraten von unter 50% führt. Das liegt größtenteils an dem Auftreten von Fernmetastasen oder lokaler Rezidive, die erhöhte Resistenz gegenüber Strahlen- oder Chemotherapie aufweisen. Zur Verbesserung des Therapieerfolges ist es daher unerlässlich Biomarker und neue therapeutische Ziele zu finden, die eine personalisierte Therapie ermöglichen. MikroRNAs sind dabei ein vielversprechendes Ziel solcher Biomarker-Studien, da es sich um kleine (ca. 18-23 Nukleotide), sehr stabile, nicht-kodierende RNA Moleküle handelt, die als wichtige Regulatoren der Genexpression fungieren.

In dieser Doktorarbeit wurde der prädiktive Stellenwert von MikroRNAs für die individuelle Therapiestratifizierung untersucht. Dafür wurde archiviertes Formalin-fixiertes Paraffin-eingebettetes Tumorgewebe von Patienten der ARO-0401 Phase III verwendet. In dieser klinischen Studie waren Patienten mit lokal fortgeschrittenen HNSCC eingeschlossen worden, die mit Radiotherapie in Kombination mit entweder 5-Fluorouracil/Mitomycin C (MMC-CRTX) oder 5-Fluorouracil/Cisplatin (CDDP-CRTX) behandelt wurden. In einer Testkohorte von 48 Patienten mit Oropharynxkarzinom wurden die Expressionslevel von 1105 humanen MikroRNAs mittels Affymetrix MikroRNA Mikroarrays bestimmt. Dabei wurden bei Patienten, die mit MMC-CRTX behandelt worden waren, 5 MikroRNAs (miR-27b, -130b, -200b, -451, -532-5p) identifiziert, die signifikant mit dem 3-Jahres-Überleben korrelieren, wohingegen 6 andere MikroRNAs (miR-125b, -146a, -150, -155, -187, -342-5p) mit dem Überleben der Patienten assoziiert waren, die mit CDDP-CRTX behandelt worden waren. Die MikroRNA Expressionslevel von miR-200b und miR-155/miR-146a wurden per real-time PCR in einer Kohorte von 78 Patienten mit Oropharynxkarzinom und 71 Patienten mit Hypopharynxkarzinom validiert. Der prädiktive Stellenwert von miR-200b und miR-155 im jeweiligen Therapiearm konnte

für Patienten mit Oropharynxkarzinomen bestätigt werden, allerdings nicht für Hypopharynxkarzinome. Interessanterweise war eine geringe Expression von miR-200b insbesondere mit dem Auftreten von Fernmetastasen assoziiert, wogegen eine niedrige Expression von miR-155 mit lokalen Rezidiven korrelierte. MiR-146a erwies sich als prognostischer Marker, der unabhängig vom Therapieregime und dem HPV Status war. Weiterhin konnte mittels nanoString PanCancer Immune Profiling eine Korrelation zwischen der Expression von miR-155 und miR-146a mit einer Infiltration von Lymphozyten in den Tumor festgestellt werden. Diese Erkenntnis verdient tiefgründiger Untersuchung, die insbesondere im Kontext von aktuellen klinischen Studien zur Kombination von CRTX mit Immun-Checkpoint-Inhibitoren interessant ist.

## Abstract

Squamous cell carcinoma of the head and neck region (HNSCC) are categorized as a group of tumors that arise in the squamous epithelium within the oral cavity, the pharynx, larynx and salivary glands. The major known risk factors are exposure to tobacco, heavy alcohol consumption and infection with human papillomaviruses (HPV).

Despite advances in treatment of HNSCC the gold standard for unresectable, locally advanced tumors is still cisplatin-based concurrent chemoradiation, which yields 5-year overall survival (OS) rates of less than 50%. This results from tumor cell resistance to radio- or chemotherapy leading to local/locoregional or distant failure. Therefore, the identification of predictive biomarkers for personalized treatment options are urgently needed. A promising source of such biomarkers are microRNAs, as they are small (18-23 nucleotides), very stable non-coding RNA molecules that serve as important regulators of gene expression.

In this doctoral research study the predictive value of microRNAs for individualized treatment selection has been evaluated. MicroRNA expression levels were measured from formalin-fixed, paraffin-embedded tumor tissues from HNSCC patients who had been treated within the ARO-0401 phase III with radiotherapy in combination with either 5-fluorouracil/mitomycin C (MMC-CRTX) or 5-fluorouracil/cisplatin (CDDP-CRTX). In a test cohort of 48 oropharyngeal carcinomas the expression levels of 1105 human microRNAs were measured by Affymetrix microRNA microarrays. Five miRNAs (miR-27b, -130b, -200b, -451, -532-5p) were found to be significantly associated with 3-year OS rates after MMC-CRTX, whereas six different microRNAs (miR-125b, -146a, -150, -155, -187, -342-5p) were correlated with OS after CDDP-CRTX. Validation of miR-200b and miR-155/miR-146a expression was performed in a patient cohort of 78 oropharyngeal and 71 hypopharyngeal carcinomas by real-time PCR, which confirmed the predictive value of miR-200b and miR-155 within their respective treatment arm in patients with oropharyngeal, but not with hypopharyngeal carcinomas. Interestingly miR-200b expression was mainly associated with distant metastasis, whereas miR-155 correlated with local recurrence. MiR-146a was revealed as a prognostic marker in patients with oropharyngeal carcinomas independently from the chemoradiation regimen and HPV status. In addition, using the nanoString PanCancer Immune Profiling Panel, an association of miR-155 and

miR-146a expression with the presence of tumour-infiltrating lymphocytes was revealed. This finding deserves more profound investigation, especially within the framework of current clinical trials of CRTX/immune checkpoint inhibitor combinations.

## Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Anne-Katrin Heß, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Der Einfluss von MikroRNAs auf die Wirksamkeit der Radiochemotherapie des lokal fortgeschrittenen Kopf-Hals-Karzinoms“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -[www.icmje.org](http://www.icmje.org)) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an den ausgewählten Publikationen entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

\_\_\_\_\_  
Unterschrift

## Anteilserklärung an der erfolgten Publikation

Anne-Katrin Heß hatte folgenden Anteil an der folgenden Publikation:

Hess AK, Mürer A, Mairinger FD, Weichert W, Stenzinger A, Hummel M, Budach V, Tinhofer I.

**MiR-200b and miR-155 as predictive biomarkers for the efficacy of chemoradiation in locally advanced head and neck squamous cell carcinoma**  
*Eur J Cancer*, 2017 February

Planung der Experimente, Literaturrecherche (90%)

Realisierung und Durchführung der Experimente:

RNA- und MikroRNA-Isolation, cDNA-Synthese und real-time PCR von MikroRNA, MikroRNA Microarray, nanoString RNA Expressions-Profiling (90%)

Datenanalyse inklusive statistische Auswertung (90%)

Erstellung des Manuskripts (90%)

Korrespondenz und Korrekturen im Reviewverfahren (90%)

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers/der betreuenden Hochschullehrerin

---

Unterschrift des Doktoranden/der Doktorandin

---

# Journal Summary List (ISI Web of Knowledge<sup>SM</sup>)

Fachzeitschriften der Kategorie: Oncology

European Journal of Cancer: *Platz 22 von 213*

*Impact Factor: 6,163*

*Eigenfaktor: 0,053*

**ISI Web of Knowledge<sup>SM</sup>**

**Journal Citation Reports<sup>®</sup>**

**Subject Category Selection**

<b>1) Select one or more categories from the list.</b> <a href="#">(How to select more than one)</a>	<div style="border: 1px solid #ccc; padding: 5px;"><p>NUCLEAR SCIENCE &amp; TECHNOLOGY</p><p>NURSING</p><p>NUTRITION &amp; DIETETICS</p><p>OBSTETRICS &amp; GYNECOLOGY</p><p>OCEANOGRAPHY</p><p style="background-color: #007bff; color: white;">ONCOLOGY</p><p>OPERATIONS RESEARCH &amp; MANAGEMENT SCIENCE</p><p>OPHTHALMOLOGY</p><p>OPTICS</p></div>
<b>2) Select to view Journal data or aggregate Category data.</b>	<p><input checked="" type="radio"/> <b>View Journal Data</b> - sort by: <input type="text" value="Impact Factor"/></p> <p><input type="radio"/> <b>View Category Data</b> - sort by: <input type="text" value="Category Title"/></p>
<input type="button" value="SUBMIT"/>	

[Acceptable Use Policy](#)  
Copyright © 2017 [Thomson Reuters](#).

Journal Summary List

[Journal Title Changes](#)

Journals from: **subject categories ONCOLOGY** [VIEW CATEGORY SUMMARY LIST](#)

Sorted by: **Impact Factor** [SORT AGAIN](#)

Journals 21 - 40 (of 213)

Navigation icons: << < [ 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 ] >> >>

Page 2 of 11

[MARK ALL](#) [UPDATE MARKED LIST](#)

Ranking is based on your journal and sort selections.

Mark	Rank	Abbreviated Journal Title <i>(linked to journal information)</i>	ISSN	JCR Data <sup>j</sup>						Eigenfactor <sup>®</sup> Metrics <sup>j</sup>	
				Total Cites	Impact Factor	5-Year Impact Factor	Immediacy Index	Articles	Cited Half-life	Eigenfactor <sup>®</sup> Score	Article Influence <sup>®</sup> Score
<input type="checkbox"/>	21	<a href="#">J HEMATOL ONCOL</a>	1756-8722	2188	6.263	5.384	0.737	118	2.8	0.00679	1.306
<input type="checkbox"/>	22	<a href="#">EUR J CANCER</a>	0959-8049	25368	6.163	5.626	1.256	285	6.7	0.05345	1.907
<input type="checkbox"/>	23	<a href="#">CANCER LETT</a>	0304-3835	23851	5.992	5.174	1.705	515	6.4	0.03757	1.252
<input type="checkbox"/>	24	<a href="#">STEM CELLS</a>	1066-5099	20716	5.902	6.872	1.403	303	6.7	0.04044	2.185
<input type="checkbox"/>	25	<a href="#">MOL CANCER</a>	1476-4598	8038	5.888	5.780	1.077	208	4.8	0.02196	1.476
<input type="checkbox"/>	26	<a href="#">CANCER-AM CANCER SOC</a>	0008-543X	62200	5.649	5.434	1.303	459	>10.0	0.08818	2.081
<input type="checkbox"/>	27	<a href="#">MOL CANCER THER</a>	1535-7163	17626	5.579	6.095	1.000	277	6.2	0.03907	1.931
<input type="checkbox"/>	28	<a href="#">BRIT J CANCER</a>	0007-0920	43597	5.569	5.617	1.282	483	7.8	0.07917	1.797
<input type="checkbox"/>	29	<a href="#">INT J CANCER</a>	0020-7136	48130	5.531	5.624	2.253	661	7.5	0.08143	1.706
<input type="checkbox"/>	30	<a href="#">MOL ONCOL</a>	1574-7891	3036	5.367	6.080	1.525	158	3.1	0.01028	1.823
<input type="checkbox"/>	31	<a href="#">CANCER METAST REV</a>	0167-7659	5420	5.316	6.621	0.638	58	7.5	0.00810	1.829
<input type="checkbox"/>	32	<a href="#">BREAST CANCER RES</a>	1465-542X	9664	5.211	6.260	1.015	134	5.5	0.02697	2.126
<input type="checkbox"/>	33	<a href="#">J THORAC ONCOL</a>	1556-0864	10099	5.040	4.932	1.432	229	4.4	0.03484	1.626
<input type="checkbox"/>	34	<a href="#">CRIT REV ONCOL HEMAT</a>	1040-8428	5457	5.039	4.280	0.843	140	6.9	0.01081	1.277
<input type="checkbox"/>	35	<a href="#">ONCOGENESIS</a>	2157-9024	586	5.021	4.338	0.409	44	2.3	0.00293	1.488
<input type="checkbox"/>	36	<a href="#">ONCOTARGET</a>	1949-2553	10452	5.008	5.415	0.714	3204	1.6	0.03088	1.359
<input type="checkbox"/>	37	<a href="#">CARCINOGENESIS</a>	0143-3334	21823	4.874	5.368	0.967	180	8.0	0.03371	1.517
<input type="checkbox"/>	38	<a href="#">CANCER IMMUNOL IMMUN</a>	0340-7004	6470	4.846	4.011	0.824	148	5.7	0.01451	1.172
<input type="checkbox"/>	39	<a href="#">RADIOTHER ONCOL</a>	0167-8140	14095	4.817	4.789	0.970	301	5.9	0.03288	1.517
<input type="checkbox"/>	40	<a href="#">ONCOLOGIST</a>	1083-7159	8960	4.789	4.930	1.037	189	6.0	0.02324	1.760

[MARK ALL](#) [UPDATE MARKED LIST](#)

Journals 21 - 40 (of 213)

Navigation icons: << < [ 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 ] >> >>

Page 2 of 11

## Ausgewählte Publikation

<https://doi.org/10.1016/j.ejca.2017.02.018>

## **Curriculum Vitae**

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

## Publikationen

- **Hess AK**, Mürer A, Mairinger FD, Weichert W, Stenzinger A, Hummel M, Budach V, Tinhofer I. MiR-200b and miR-155 as predictive biomarkers for the efficacy of chemoradiation in locally advanced head and neck squamous cell carcinoma. *Eur J Cancer*, 2017 Febr., **Impact Factor: 6.16**
- **Heß AK**, Weichert W, Budach V, Tinhofer I. Die Bedeutung von MiRNA für das Kopf-Hals-Karzinom. *HNO*, 2016 Jan., **Impact Factor: 0.85**
- **Hess AK**, Saffert P, Liebeton K, Ignatova Z. Optimization of translation profiles enhances protein expression and solubility. *PLoS One*. 2015 Mai, **Impact Factor: 3.06**
- **Heß AK**, Bartel M, Roth K, Messerschmidt K, Heilmann K, Kenchington E, Micheel B, Stuckas H. Expression of M6 and M7 lysin in *Mytilus edulis* is not restricted to sperm, but occurs also in oocytes and somatic tissue of males and females. *Mol Reprod Dev.*, 2012 Aug., **Impact Factor: 2.54**

## Vorträge

---

- Immune-Related Gene Expression Signatures as Predictive Biomarkers For Outcome After Concurrent Chemoradiation in Patients with Locally Advanced Oropharyngeal Carcinomas.  
*26. Symposium Experimentelle Strahlentherapie und Klinische Strahlenbiologie.*  
Tübingen, Deutschland 2017
- Immune-Related Gene Expression Signatures as Predictive Biomarkers For Outcome After Concurrent Chemoradiation in Patients with Locally Advanced Oropharyngeal Carcinomas.  
*Jahrestagung der Deutschen, Österreichischen und Schweizerischen Gesellschaften für Hämatologie und Onkologie.* Leipzig, Deutschland 2016
- Die Bedeutung von MicroRNA- und Immun-Profilen von lokal fortgeschrittenen Kopf-Hals-Karzinomen als prädiktive Biomarker für die Wirksamkeit der Radiochemotherapie  
*25. Symposium Experimentelle Strahlentherapie und Klinische Strahlenbiologie.*  
Dresden, Deutschland 2016
- Identifizierung von MicroRNAs als potentielle Biomarker für die Wirksamkeit von Radio-Chemotherapie beim lokal fortgeschrittenen Kopf-Hals-Karzinom.  
*86. Jahresversammlung Deutsche Gesellschaft für Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde, Kopf- und Hals-Chirurgie e. V.* Berlin, Deutschland 2015

- Influence of microRNA expression profiles on the efficacy of radiochemotherapy in locally advanced head and neck squamous cell carcinoma.  
*1<sup>st</sup> International Symposium on Tumor-Host Interaction in Head and Neck Cancer.* Essen, Deutschland 2015
- Exosomal microRNA species as potential determinants of resistance to radiochemotherapy in head and neck carcinoma.  
*Charité Comprehensive Cancer Center Workshop Liquid Biopsy - Translational Research and Clinical Implications/Applications.* Berlin, Deutschland 2014

## Poster

---

- Influence of microRNA profiles and immune signatures on the efficacy of radiochemotherapy in locally advanced head and neck squamous cell carcinoma. *32. Deutscher Krebskongress.* Berlin, Deutschland 2016
- Influence of miRNA expression profiles on the efficacy of radiochemotherapy in locally advanced head and neck squamous cell carcinoma.  
*40<sup>th</sup> FEBS Congress, The Biochemical Basis of Life.* Berlin, Deutschland 2015

## Danksagung

In erster Linie möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. Ingeborg Tinhofer-Keilholz bedanken, die es mir ermöglichte, meine Doktorarbeit in ihrer Arbeitsgruppe anzufertigen. Insbesondere gilt mein Dank der Bereitstellung der spannenden Thematik, sowie der umfangreichen finanziellen und intellektuellen Unterstützung zur Überprüfung von teils weit hergeholten Hypothesen.

Ganz herzlich möchte ich mich bei Robert Kenschak bedanken, der mich in jeglicher Hinsicht bei der Erstellung der Arbeit unterstützte, egal ob es sich dabei um die Vermittlung von technisch-methodischem Wissen oder um aufmunternde Worte handelte.

Darüber hinaus, bedanke ich mich beim ganzen Team des translationalen Labors für Strahlenbiologie und Radioonkologie für drei wunderbare Jahre voller hilfreicher Unterstützung, anregender Diskussionen und nicht zuletzt freundschaftlicher Verbundenheit.

Ein besonderer Dank gilt meiner Familie und meinem Partner, Lars Enger, für den immerwährenden Rückhalt während meiner Promotionszeit.