

Aus der
Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie und Radioonkologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Professor Dr. med. Claus Belka

Molekulare Prädiktoren der Therapieresistenz bei Kopf-Hals-Tumoren



Kumulative Habilitationsschrift
zur Erlangung der Venia Legendi
für das Fach Strahlenbiologie

vorgelegt von
Dr. rer. nat. Julia Hess

2025

Für Lenny & Lina

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	4
2	EIGENE WISSENSCHAFTLICHE ARBEITEN	10
2.1	ETABLIERUNG UND CHARAKTERISIERUNG VON KOPF-HALS-TUMOR-PATIENTENKOLLEKTIVEN IM RAHMEN DER KLINISCHEN KOOPERATIONSGRUPPE „PERSONALISIERTE RADIOTHERAPIE BEI KOPF- HALS-TUMOREN“	11
2.1.1	<i>Klinische Charakterisierung der LMU-KKG-HNSCC-Kollektive.....</i>	<i>11</i>
2.1.2	<i>Gewebeprobenaufarbeitung für molekulare Analysen</i>	<i>14</i>
2.1.3	<i>p16-HPV/DNA-Charakterisierung</i>	<i>14</i>
2.1.4	<i>Multi-level Omics-Datengenerierung.....</i>	<i>17</i>
2.2	MOLEKULARE ABERRATIONEN ASSOZIIERT MIT DEM HPV-STATUS.....	18
2.3	GENOMISCHE AMPLIFIKATION VON FANCA UND DEREN EINFLUSS AUF DIE RADIORESISTENZ BEIM HNSCC	21
2.4	PROGNOSTISCHE VIER-GEN-EXPRESSIONS-SIGNATUR 16Q24.3 LOKALISierter GENE	23
2.5	PROGNOSTISCHE FÜNF-MIRNA-SIGNATUR IN HPV-NEGATIVEN HNSCC.....	26
2.6	THERAPIEASSOZIIERTE MOLEKULARE SUBTYPEN BEIM PRIMÄREN UND REZIDIERTEN HNSCC.....	31
2.7	INTEGRATION VON P16/HPV-DNA-STATUS MIT EINEM 24-MIRNA-DEFINIERTEN MOLEKULAREN PHÄNOTYP	35
2.8	ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK	38
3	LITERATURVERZEICHNIS.....	39
4	VERZEICHNIS DER ORIGINALARBEITEN	48
4.1	ORIGINALARBEITEN ALS ERST- ODER LETZTAUTORIN	48
4.2	ORIGINALARBEITEN ALS KOAUTORIN	50
4.3	ÜBERSICHTSARTIKEL / REVIEWS.....	55
4.4	SONSTIGE VERÖFFENTLICHUNGEN (EDITORIAL)	56
5	DANKSAGUNG.....	57
6	FUNDSTELLEN DER ZUGRUNDELIEGENDEN ORIGINALARBEITEN.....	58

1 Einleitung

Maligne Tumore des Kopf-Hals-Bereichs gehören mit einer jährlichen Inzidenz von weltweit 660.000 Fällen und 300.000 Todesfällen zu den fünf häufigsten Krebserkrankungen [43,83]. Etwa 90 % aller Kopf-Hals-Tumore sind Plattenepithelkarzinome (*head and neck squamous cell carcinoma*, HNSCC), wobei die meisten HNSCC in der epithelialen Auskleidung der Mundhöhle, des Oropharynx, Larynx und Hypopharynx entstehen [44].

Beim HNSCC handelt es sich um eine multifaktorielle Erkrankung mit starkem Tabakkonsum und Alkoholmissbrauch als Hauptrisikofaktoren, die in Kombination ein noch höheres Risiko darstellen [4,12,69]. Als weiterer Risikofaktor für HNSCC hat die Infektion mit humanen Papillomviren (HPV) in den letzten zwei Jahrzehnten immer mehr an Bedeutung gewonnen. Genomische HPV-DNA, vor allem der Hochrisiko-HPV-Varianten HPV-16 und HPV-18, ist in circa 30 % aller HNSCC nachweisbar, insbesondere bei oropharyngeal lokalisierten Tumoren – circa 45 % der Oropharynxkarzinome sind HPV-positiv [60,98]. Der immunhistochemische Nachweis einer p16^{INK4a}-Überexpression, idealerweise in Kombination mit dem Nachweis von HPV-DNA, dient als Surrogatmarker für eine HPV-Infektion [84,86]. HPV-assoziierte HNSCC zeichnen sich im Vergleich zu nicht-HPV-assoziierten HNSCC durch eine deutlich günstigere Prognose nach Radio(chemo)therapie aus und werden mittlerweile als eigenständige klinische Entität betrachtet. Dies wurde in der 8. Auflage des TNM-Klassifikationssystems für p16-positive Karzinome des Oropharynx berücksichtigt [2,63,64].

Die Fünf-Jahres-Gesamtüberlebensrate von Patienten mit HNSCC beträgt etwa 65 % [4,73]. Bei etwa einem Drittel der Patienten liegt eine Erkrankung im Frühstadium ohne Lymphknotenbeteiligung vor (T1/T2, N0). Die Behandlung früher HNSCC-Stadien (Stage I, II) ohne weitere Risikofaktoren besteht in der Regel entweder aus Operation oder Radio(chemo)therapie, wobei mit beiden Ansätzen vergleichbare, sehr hohe Heilungsraten erzielt werden. Am häufigsten wird das HNSCC jedoch als lokoregionär fortgeschrittene Erkrankung (Stage III, IVa/b) diagnostiziert, meist mit regionaler Beteiligung der zervikalen Lymphknoten. In Abhängigkeit vom

Tumorstadium besteht die Indikation zu einer multimodalen Therapie in kurativer Intention, wobei die Radio(chemo)therapie neben der operativen Tumorentfernung die Standardtherapie bei lokal fortgeschrittenen HNSCC darstellt. Bei Patienten mit positiven mikroskopischen Resektionsrändern und/oder extrakapsulärem Wachstum von Lymphknotenmetastasen hat die postoperative simultane Radiochemotherapie mit Cisplatin eine Verbesserung der lokoregionären Kontrollrate und des tumorfreien Überlebens gezeigt [10,11,25,26]. Trotz aller Optimierungen in der Behandlung fortgeschrittener HNSCC ist das Risiko eines lokoregionären oder distanten therapeutischen Versagens hoch: etwa 30-40 % der nicht-HPV-assoziierten Patienten entwickeln ein Rezidiv der Erkrankung. Die ausgeprägte Strahlenempfindlichkeit des Normalgewebes setzt einer weiteren Intensivierung konventioneller adjuvanter oder definitiver Radio(chemo)therapieansätze im Sinne einer Dosisescalation Grenzen. Typische Nebenwirkungen einer Bestrahlung sind Mukositis, Xerostomie oder auch fibrotische Gewebeveränderungen [16,17,65,97]. Auch die Einführung kombinierter Therapiestrategien mit zielgerichteten Inhibitoren führte zu neuen und teilweise unerwarteten toxischen Nebenwirkungen [55,62,72]. Darüber hinaus sind die kurativen Behandlungsmöglichkeiten für Kopf-Hals-Tumor-Patienten mit Lokalrezidiven eingeschränkt [96]. Aktuelle Forschungsanstrengungen zielen daher auf die Entwicklung und den Einsatz von Substanzen ab, die in Kombination mit der Strahlentherapie das Tumoransprechen und damit den Therapieerfolg verbessern, ohne die Normalgewebstoxizität zu erhöhen.

Die zelluläre Strahlenantwort und die damit verknüpfte intrinsische oder erworbene Strahlenresistenz von Tumoren sowie die Strahlenreaktion des Normalgewebes sind essentielle Determinanten des strahlentherapeutischen Erfolgs [68]. Während die molekulare Landschaft von Kopf-Hals-Tumoren und die damit in Verbindung stehenden veränderten Signalwege schon sehr gut charakterisiert sind, sind die Ursachen für die Ausprägung eines strahlenresistenten Phänotyps bisher nur in Ansätzen verstanden [1,20,49,87]. Ebenso wenig sind ausreichend validierte Marker verfügbar, die eine zelluläre Strahlenreaktion oder ein Therapieversagen sicher vorhersagen können.

Die molekulare Landschaft von HNSCC ist durch komplexe, heterogene genomische Aberrations- und Mutationsmuster charakterisiert, die zahlreiche Tumorsuppressor- und Onkogene und meist an der Zellzykluskontrolle beteiligte Signalwege betreffen. Die am häufigsten von molekularen Veränderungen betroffenen Gene bei HNSCC sind TP53, CCND1, CDKN2A, PIK3CA, EGFR, NOTCH1 und PTEN [1,20,34,36,49,61,71,87]. Dabei stellt die Amplifikation von Cyclin D1 (CCND1) auf Chromosom 11q13, welche in etwa 80 % aller HNSCC nachweisbar ist, eine sehr frühe Veränderung dar [85].

In bisherigen Studien wurde die Radioresistenz von HNSCC-Zellen auf Veränderungen in den EGFR- und PI3K / Akt / mTOR-Signalwegen, der P53-Signalkaskade sowie DNA-Reparaturproteinen wie Ku80 zurückgeführt [52,59,68]. Zudem weiß man mittlerweile, dass auch das Tumorstroma bzw. das Tumormikromilieu einen großen Einfluss auf die Ausprägung von Strahlenresistenz haben. Hierbei sind der Vaskularisierungs- und Oxygenierungsstatus des Tumors von Bedeutung [66]. Darüber hinaus wird dem Immunsystem eine sehr wichtige Rolle bei der Effizienz einer Strahlentherapie zugeschrieben [7,32,45].

Cetuximab, ein monoklonaler, gegen den epidermalen Wachstumsfaktorrezeptor (EGFR) gerichteter Antikörper, war die erste zugelassene zielgerichtete Substanz in der HNSCC-Therapie [48,77]. In zahlreichen klinischen Studien wurden bereits Inhibitoren und Antikörper des EGFR-Signalwegs im Hinblick auf eine verbesserte therapeutische Antwort des Tumors untersucht, allerdings ohne den erhofften Fortschritt im kurativen Setting zu erzielen (RTOG 0522 Studie) [3,13,14]. Auch Deeskalationsstudien bei HPV-assoziierten HNSCC (RTOG 1016, De-ESCALaTE), bei denen die Standardbehandlung mit Cisplatin durch Cetuximab ersetzt wurde, zeigten schlechtere Tumorkontroll- und Überlebensraten [94]. Zudem wurden bei EGFR-Inhibitor-Behandlungen Resistenzen beobachtet, die sich durch Überschneidungen und wechselseitige Beeinflussungen verschiedener Signalwege erklären lassen [18,21,27]. In der palliativen Situation dagegen führte die Behandlung mit Cetuximab in Kombination mit Platin und 5-FU nach dem EXTREME-Schema zu einem signifikant längeren Überleben und wurde dadurch zum Therapiestandard [95].

In den letzten Jahren hat die Immuntherapie mit Checkpoint-Inhibitoren Einzug in die HNSCC-Behandlung gehalten. Tumorzellen können durch die verstärkte Expression des Transmembranproteins PD-L1 die Checkpoints des Immunsystems durch Bindung an den PD-1-Rezeptoren der T-Zellen umgehen. Checkpoint-Inhibitoren sind in der Lage die Interaktion zwischen PD-1 und PD-L1 zu blockieren und dem Immune Escape von Tumoren entgegenzuwirken. Die Standardbehandlung rezidivierter und/oder metastasierter Kopf-Hals-Tumore nach dem EXTREME-Schema wurde sowohl in der Zweitlinien- (Studien CheckMate-141 mit Nivolumab und KEYNOTE-040 mit Pembrolizumab) als auch in der Erstlinientherapie (KEYNOTE-048 Studie mit Pembrolizumab) durch eine Therapie mit einem PD-1-Inhibitor als Monotherapie oder in Kombination mit Chemotherapie abgelöst [19,24,29,30]. Derzeit werden in zahlreichen klinischen Studien unterschiedliche Einsatzmöglichkeiten von Checkpoint-Inhibitoren untersucht. Inwieweit die Strahlentherapie in Kombination mit Immuntherapie im kurativen Setting in der Lage ist die Wirksamkeit der Behandlung zu verbessern, ist derzeit offen.

Auf verschiedenen molekularen Ebenen – einschließlich genomischer, miRNA-, mRNA- und Proteinebene – wurden bereits Marker und Vorhersagemodelle identifiziert, die mit der Prognose von HNSCC-Patienten assoziiert sind [6,9,23,28,33,35,42,46,50,67,74,76,89,91,92,102,103]. Obwohl beispielsweise die Immunantwortsignatur von Chung *et al.* (2004) und die von Eustace *et al.* (2013) und Toustrup *et al.* (2012) entwickelten Hypoxiesignaturen validiert werden konnten [23,28,46,89,92], ist die Überlappung prognostischer molekularer Marker in verschiedenen HNSCC-Studien im Allgemeinen gering, und die klinische Implementierung der meisten molekularen Marker scheitert an einer ausreichend erfolgreichen Validierung in unabhängigen Patientenkollektiven. Hierfür existieren eine Vielzahl an möglichen Faktoren, wie Unterschiede in den untersuchten Patientengruppen (z. B. Demographie, Behandlungsparameter, Tumorlokalisation und HPV-Status), methodische Aspekte wie die Auswahl und Anzahl der untersuchten Moleküle, Unterschiede in den verwendeten Analyseplattformen, Einschränkungen durch kleine

Stichprobengrößen, die Analyse verschiedener Endpunkte sowie unvollständige klinische Annotationen der Datensätze (z. B. HPV-Status) [82].

Die vorliegende kumulative Habilitationsschrift beschreibt meine wissenschaftlichen Arbeiten zur molekularen Charakterisierung des lokal fortgeschrittenen Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinoms anhand klinisch präzise annotierter Patientenkollektive sowie die mechanistische Untersuchung von Zellkulturmodellen zur Identifizierung potenzieller therapeutischer Angriffspunkte. Ziel war die Identifikation von molekularen Markern und Prädiktionsmustern, die das Therapieansprechen bei der Radio- und Radiochemotherapie des HNSCC vorhersagen, eine Risikostratifizierung der Patienten ermöglichen und Ansatzpunkte für verbesserte Therapieansätze liefern.

Der erste Teilabschnitt der Habilitationsschrift beschäftigt sich mit Kopf-Hals-Tumor-Patientenkollektiven, die ich in enger Zusammenarbeit im Rahmen der klinischen Kooperationsgruppe (KKG) „Personalisierte Radiotherapie bei Kopf-Hals-Tumoren“ mit aufgebaut habe. Die KKG ist ein kooperativer Zusammenschluss von Wissenschaftlern und Klinikern des Helmholtz Zentrums München (Abteilung Translationale Metabolische Onkologie, Prof. Zitzelsberger), der Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie und Radioonkologie des Klinikums der Ludwig-Maximilians-Universität (LMU) München (Prof. Belka), der LMU-Klinik und Poliklinik für Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde (Prof. Canis) und des Instituts für Pathologie der LMU München (Prof. Klauschen). Für die Bearbeitung der oben genannten Fragestellungen wurden Kollektive adjuvant bzw. definitiv strahlen(chemo)therapierter HNSCC-Patienten etabliert. Dies beinhaltete zum einen in Zusammenarbeit mit dem LMU-Institut für Pathologie die Aufbereitung der Patientenproben und zum anderen in Zusammenarbeit mit den klinischen Kooperationspartnern die umfassende und präzise Annotation der generierten Multi-Level-Omics-Daten mit klinischen Daten und molekularen Charakteristika wie dem HPV-Status.

Der zweite Teil der Habilitationsschrift beschäftigt sich mit molekularen Prädiktoren der Therapieresistenz bei lokal fortgeschrittenen Kopf-Hals-Tumoren. So konnten wir prognostische Marker und Modelle auf genomischer, miRNA- und mRNA-Ebene identifizieren, die in Kombination mit etablierten prognostischen

klinischen Parametern das Therapieansprechen vorhersagen und eine Risikostratifizierung des lokal fortgeschrittenen HNSCC auf individueller Ebene ermöglichen. Darüber hinaus wurden *in vitro* Zellkulturmodelle hinsichtlich molekularer Mechanismen, die den Unterschieden im Behandlungserfolg der stratifizierten Patientensubgruppen zugrunde liegen, analysiert. Ein wichtiger Schritt war die transkriptomische und genomische Charakterisierung von gepaarten Primär- und Rezidivtumoren des Kopf-Hals-Bereichs, die wichtige neue Erkenntnisse einerseits über die Entstehung von Rezidiven und andererseits über therapierelevante molekulare Eigenschaften von Rezidivtumoren erbracht hat. Ein weiterer Fokus lag auf der Identifizierung und Charakterisierung von Subgruppen innerhalb HPV-assoziiierter und nicht-HPV-assoziiierter HNSCC, die sich auf transkriptomischer und miRNA-Ebene sowie hinsichtlich des Therapieansprechens unterscheiden.

.

2 Eigene wissenschaftliche Arbeiten

Der vorliegenden kumulativen Habilitationsschrift zu molekularen Prädiktoren der Therapieresistenz bei Kopf-Hals-Tumoren liegen im Wesentlichen folgende Originalarbeiten zu Grunde, welche im Weiteren kurz beschrieben und zusammengefasst werden:

Etablierung und Charakterisierung von Kopf-Hals-Tumor-Patientenkollektiven

- Maihofer, C.; Schüttrumpf, L.; Macht, C.; Pflugradt, U.; **Hess, J.**; Schneider, L.; Woischke, C.; Walch, A.; Baumeister, P.; Kirchner, T.; Zitzelsberger, H.; Belka, C.; Ganswindt, U. Postoperative (chemo) radiation in patients with squamous cell cancers of the head and neck - clinical results from the cohort of the clinical cooperation group "Personalized Radiotherapy in Head and Neck Cancer". *Radiation oncology* **2018**, 13, 123, doi:10.1186/s13014-018-1067-1. (IF: 2,895)
- Schüttrumpf, L.; Marschner, S.; Scheu, K.; **Hess, J.**; Rietzler, S.; Walch, A.; Baumeister, P.; Kirchner, T.; Ganswindt, U.; Zitzelsberger, H.; Belka, C.; Maihofer, C. Definitive chemoradiotherapy in patients with squamous cell cancers of the head and neck - results from an unselected cohort of the clinical cooperation group "Personalized Radiotherapy in Head and Neck Cancer". *Radiation oncology* **2020**, 15, 7, doi:10.1186/s13014-019-1452-4. (IF: 3,481)

Molekulare Prädiktoren der Therapieresistenz bei Kopf-Hals-Tumoren

- **Hess, J.**; Unger, K.; Orth, M.; Schotz, U.; Schüttrumpf, L.; Zangen, V.; Gimenez-Aznar, I.; Michna, A.; Schneider, L.; Stamp, R.; Selmansberger, M.; Braselmann, H.; Hieber, L.; Drexler, G.A.; Kuger, S.; Klein, D.; Jendrossek, V.; Friedl, A.A.; Belka, C.; Zitzelsberger, H.; Lauber, K. Genomic amplification of Fanconi anemia complementation group A (FancA) in head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC): Cellular mechanisms of radioresistance and clinical relevance. *Cancer Lett* **2017**, 386, 87-99, doi:10.1016/j.canlet.2016.11.014. (IF 6,491)
- Wintergerst, L.; Selmansberger, M.; Maihofer, C.; Schüttrumpf, L.; Walch, A.; Wilke, C.; Pitea, A.; Woischke, C.; Baumeister, P.; Kirchner, T.; Belka, C.; Ganswindt, U.; Zitzelsberger, H.; Unger, K.; **Hess, J.** A prognostic mRNA expression signature of four 16q24.3 genes in radio(chemo)therapy-treated head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC). *Mol Oncol* **2018**, 12, 2085-2101, doi:10.1002/1878-0261.12388. (IF: 5,962)
- **Hess, J.**; Unger, K.; Maihofer, C.; Schüttrumpf, L.; Wintergerst, L.; Heider, T.; Weber, P.; Marschner, S.; Braselmann, H.; Samaga, D.; Kuger, S.; Pflugradt, U.; Baumeister, P.; Walch, A.; Woischke, C.; Kirchner, T.; Werner, M.; Werner, K.; Baumann, M.; Budach, V.; Combs, S.E.; Debus, J.; Grosu, A.L.; Krause, M.; Linge, A.; Rodel, C.; Stuschke, M.; Zips, D.; Zitzelsberger, H.; Ganswindt, U.; Henke, M.; Belka, C. A Five-MicroRNA Signature Predicts Survival and Disease Control of Patients with Head and Neck Cancer Negative for HPV Infection. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research* **2019**, 25, 1505-1516, doi:10.1158/1078-0432.CCR-18-0776. (IF 10,107)
- Weber, P.*; Kunstner, A.*; **Hess, J.***; Unger, K.*; Marschner, S.; Idel, C.; Ribbat-Idel, J.; Baumeister, P.; Gires, O.; Walz, C.; Rietzler, S.; Valeanu, L.; Herkommer, T.; Kreutzer, L.; Klymenko, O.; Drexler, G.; Kirchner, T.; Maihofer, C.; Ganswindt, U.; Walch, A.; Sterr, M.; Lickert, H.; Canis, M.; Rades, D.; Perner, S.; Berriel Diaz, M.; Herzig, S.; Lauber, K.; Wollenberg, B.; Busch, H.; Belka, C.; Zitzelsberger, H. Therapy-Related Transcriptional Subtypes in Matched Primary and Recurrent Head and Neck Cancer. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research* **2022**, 28, 1038-1052, doi:10.1158/1078-0432.CCR-21-2244. *geteilte Erstautorenschaft (IF 11,5)
- **Hess, J.**; Unger, K.; Maihofer, C.; Schüttrumpf, L.; Weber, P.; Marschner, S.; Wintergerst, L.; Pflugradt, U.; Baumeister, P.; Walch, A.; Woischke, C.; Kirchner, T.; Werner, M.; Sorensen, K.; Baumann, M.; Tinhofer, I.; Combs, S.E.; Debus, J.; Schafer, H.; Krause, M.; Linge, A.; von der Grun, J.; Stuschke, M.; Zips, D.; Canis, M.; Lauber, K.; Ganswindt, U.; Henke, M.; Zitzelsberger, H.; Belka, C. Integration of p16/HPV DNA Status with a 24-miRNA-Defined Molecular Phenotype Improves Clinically Relevant Stratification of Head and Neck Cancer Patients. *Cancers (Basel)* **2022**, 14, doi:10.3390/cancers14153745. (IF 5,2)

2.1 Etablierung und Charakterisierung von Kopf-Hals-Tumor-Patientenkollektiven im Rahmen der klinischen Kooperationsgruppe „Personalisierte Radiotherapie bei Kopf-Hals-Tumoren“

2.1.1 Klinische Charakterisierung der LMU-KKG-HNSCC-Kollektive

Maihoefer, C.; Schüttrumpf, L.; Macht, C.; Pflugradt, U.; **Hess, J.**; Schneider, L.; Woischke, C.; Walch, A.; Baumeister, P.; Kirchner, T.; Zitzelsberger, H.; Belka, C.; Ganswindt, U. Postoperative (chemo) radiation in patients with squamous cell cancers of the head and neck - clinical results from the cohort of the clinical cooperation group "Personalized Radiotherapy in Head and Neck Cancer". ***Radiation oncology*** **2018**, 13, 123, doi:10.1186/s13014-018-1067-1. (IF: 2,895)

Schüttrumpf, L.; Marschner, S.; Scheu, K.; **Hess, J.**; Rietzler, S.; Walch, A.; Baumeister, P.; Kirchner, T.; Ganswindt, U.; Zitzelsberger, H.; Belka, C.; Maihoefer, C. Definitive chemoradiotherapy in patients with squamous cell cancers of the head and neck - results from an unselected cohort of the clinical cooperation group "Personalized Radiotherapy in Head and Neck Cancer". ***Radiation oncology*** **2020**, 15, 7, doi:10.1186/s13014-019-1452-4. (IF: 3,481)

Als Grundlage für die im Weiteren unter 2.2-2.7 beschriebenen molekularen Arbeiten wurden im Rahmen der klinischen Kooperationsgruppe (KKG) „Personalisierte Radiotherapie bei Kopf-Hals-Tumoren“ HNSCC-Patientenkollektive etabliert (Abteilung Translationale Metabolische Onkologie, Helmholtz Zentrum München, Prof. Zitzelsberger; Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie und Radioonkologie der LMU München, Prof. Belka; LMU-Klinik und Poliklinik für Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde, Prof. Canis und Pathologisches Institut der LMU, Prof. Kirchner / Prof. Klauschen). Eingeschlossen wurden Patientinnen und Patienten mit Plattenepithelkarzinom (HNSCC) der Mundhöhle, des Oropharynx, des Hypopharynx oder des Larynx, die ab dem Jahr 2008 an der Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie und Radioonkologie (LMU RadOnc) strahlentherapeutisch behandelt wurden („LMU-KKG-Kollektive“). Für die Datenerfassung und deren Management wurde in der LMU RadOnc eine Datenbank aufgebaut, die eine Pseudo-Anonymisierung der Patienten implementiert. 435 Patienten wurden retrospektiv eingeschlossen und vor Beginn der KKG behandelt (2008 bis Ende 2012). Zusätzlich wurden die klinischen und histopathologischen Parameter sowie das klinische Follow-up aller ab 2013 behandelten

Patienten erfasst. Circa 60 % aller eingeschlossenen LMU-KKG-HNSCC-Patienten erhielten eine postoperative adjuvante Radio(chemo)therapie. Circa 40 % der Patienten wurden ausschließlich mit einer definitiven Radio(chemo)therapie behandelt. Patienten mit hohem lokoregionärem Rezidivrisiko (*close-margin-/R1-Resektion* oder extrakapsuläres Wachstum der Lymphknotenmetastasen) erhielten neben der Radiotherapie eine simultane Chemotherapie. Die Mehrheit der Patienten (circa 75 %) erhielt dabei Cisplatin (CDDP) in Kombination mit 5-Fluorouracil (5-FU) nach dem Fietkau-Protokoll (CDDP: 20 mg/m², Tag 1–5, Tag 29–33; 5-FU: 600 mg/m², Tag 1–5, Tag 29–33;). In einzelnen Fällen wurde die Cisplatin-basierte Chemotherapie durch Mitomycin C (MMC) oder 5-FU/MMC ersetzt.

Für die HNSCC-Kollektive liegen umfassende klinische und histopathologische Patientendaten vor, die, sofern zutreffend, folgende Parameter einschließen: Alter, Geschlecht, HPV-Status (siehe 2.1.3), Tumorlokalisation, UICC-TNM-Stadium, Resektionsstatus, Grading, extrakapsuläres Wachstum der Lymphknotenmetastasen (ECE), Lymphovaskuläre Invasion (LVI), Perineuralscheideninfiltration (PNI), venöse Tumorerinvasion, Komorbiditäten (ECOG, ACE), Rauchen/Alkohol, Radiotherapie (RT) Gesamtdosis, RT-Dosis Zielvolumen 1.-3. Ordnung, RT-Einzeldosis, RT-Dauer und verabreichte Chemotherapie. Es liegen belastbare, kurierte Follow-up Daten und Informationen bezüglich folgender Endpunkte vor: lokale Kontrolle, lokoregionäre Kontrolle, distante Kontrolle, Rezidivfreiheit, Gesamtüberleben, krankheitsspezifisches Überleben, rezidivfreies Überleben.

Die klinische Charakterisierung aller nicht-selektionierten HNSCC-Patienten, die an der LMU-Klinik für Strahlentherapie und Radioonkologie mit definitiver oder adjuvanter Strahlen(chemo)therapie behandelt wurden, erfolgte im Hinblick auf Outcome und Therapieversagen sowie auf zuvor beschriebene und etablierte Risikofaktoren [53,79]:

- Es wurden 302 Patienten (mediane Nachbeobachtungszeit: 45 Monate, medianes Alter: 60,7 Jahre) identifiziert, die eine **postoperative adjuvante Radio(chemo)therapie** (median Gesamtdosis: 64 Gy) erhalten haben. In 58 % der Fälle wurde zusätzlich eine Chemotherapie durchgeführt, überwiegend Cisplatin/5-Fluorouracil in Übereinstimmung mit der ARO 96-3-Studie [31]. Die 3-

Jahres-Gesamtüberlebensrate sowie die lokalen, lokoregionären und distanten Rezidivierungsraten lagen bei 70,5 %, 9,7 %, 12,2 % bzw. 13,5 %. HPV-assoziierte Oropharynxkarzinome waren in der multivariaten Analyse mit einer signifikant verbesserten Gesamtüberlebens-, Lokal-, Fern- und Gesamttumorkontrollrate assoziiert. Darüber hinaus waren in der multivariaten Analyse für das lokale Versagen der Resektionsstatus und eine perineurale Invasion, für das lokoregionäre und distante Versagen die extrakapsuläre Lymphknotenextension und für das Gesamtüberleben der Lymphknotenbefall signifikant ungünstige prognostische Faktoren. 138 Patienten wurden in Übereinstimmung mit dem ARO 96-3-Protokoll leitliniengerecht behandelt, was die Ergebnisse der Studie untermauert [53].

- Es wurden 184 Patienten (mediane Nachbeobachtungszeit: 65 Monate, medianes Alter: 64 Jahre) identifiziert, die eine **definitive Radio(chemo)therapie** (mediane Gesamtdosis: 70 Gy) erhalten haben. In 90,2 % der Fälle wurde eine gleichzeitige Chemotherapie appliziert, meist Mitomycin C / 5-FU in Übereinstimmung mit der ARO 95-06-Studie. Die 3-Jahres-Gesamtüberlebensrate (OS) sowie die lokalen, lokoregionären und distanten Rezidivierungsraten betrugen 42,7 %, 29,8 %, 34,0 % bzw. 23,4 %. HPV-assoziierte Oropharynxkarzinome und kleinere makroskopische Tumervolumen waren in der multivariaten Analyse mit einer signifikant verbesserten lokoregionären Tumorkontrollrate, krankheitsfreiem Überleben (DFS) und OS verbunden. Darüber hinaus waren in der univariaten Analyse niedrigere Hämoglobinwerte signifikant mit einem schlechteren DFS und OS assoziiert. Das Ausmaß des Lymphknotenbefalls war mit distanter Metastasierung, DFS und OS assoziiert. 92 Patienten (50 %) wurden in Übereinstimmung mit der ARO 95-06-Studie leitliniengerecht behandelt, was die Ergebnisse dieser Studie untermauert [79].

2.1.2 Gewebeprobenaufarbeitung für molekulare Analysen

Für die LMU-KKG-Kollektive wurden am LMU-Institut für Pathologie (Prof. Kirchner / Prof. Klauschen) nach Pseudonymisierung geeignete Formalin-fixierte Paraffin-eingebettete (FFPE) Tumorgewebeblöcke ausgewählt und für die weiteren molekularen Analysen bereitgestellt. Im Rahmen meiner Habilitation wurden 349 HNSCC-Primärtumore der retrospektiven LMU-KKG-Kollektive adjuvant (n = 224) bzw. definitiv (n = 125) strahlen(chemo)therapeutisch behandelter Patienten erhalten, aufgearbeitet und molekularbiologisch untersucht. Die Verarbeitung der FFPE-Tumorproben wurde in Zusammenarbeit mit Prof. Axel Walch (Abteilung Analytische Pathologie, Helmholtz Zentrum München) durchgeführt. Von jedem Gewebeblock wurden Serienschritte auf Objektträgern angefertigt, wobei jeweils der erste und der letzte Schnitt mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt und einer histopathologischen Bewertung unterzogen wurde. Das zu untersuchende Tumorareal wurde gekennzeichnet, wobei nur Tumorproben mit einer Tumorzellularität von mindestens 60 % eingeschlossen wurden. Vor der simultanen DNA- und RNA-Nukleinsäureextraktion wurden die Gewebeschnitte entparaffiniert und mikrodisektiert. Die extrahierten Nukleinsäuren wurden anschließend einer Qualitätskontrolle sowie einer Quantitätsbestimmung unterzogen.

2.1.3 p16-HPV/DNA-Charakterisierung

Wie bereits zuvor beschrieben, zeichnen sich HPV-assoziierte HNSCC im Vergleich zu nicht-HPV-assoziierten HNSCC durch eine deutlich günstigere Prognose nach erfolgter Radio(chemo)therapie aus [63,64]. Somit ist gerade bei HNSCC-Studien zur Identifikation prognostischer Marker eine vollständige Charakterisierung der Tumore hinsichtlich HPV-Status von entscheidender Bedeutung. Der HPV-Status der HNSCC-Primärtumore der LMU-KKG-Kollektive adjuvant und definitiv strahlen(chemo)therapeutisch behandelter Patienten erfolgte durch p16^{Ink4a}-Immunhistochemie (IHC) in Kombination mit dem Nachweis Mukosa-assoziiierter HPV-DNA. Die immunhistochemische p16^{INK4a}-Färbung, die als Surrogatmarker für die HPV-Infektion verwendet wird, wurde mit dem CINtec TM Histology Kit (Roche) mit Hilfe des Ventana Färbeautomaten durchgeführt. Tumorproben mit starker oder diffuser

nuklearer und zytoplasmatischer Färbung in mehr als 70 % der Tumorzellen wurden als p16-positiv eingestuft, während Gewebe mit nur schwach diffuser oder fehlender Färbung als p16-negativ eingestuft wurden [2]. Darüber hinaus wurde der Nachweis Mukosa-assoziiierter HPV-DNA mittels quantitativer Echtzeit-PCR durchgeführt (GP 5+/6+ Primer) [40,51]. Eine Tumorseite wurde final als HPV-positiv klassifiziert, sofern sie sowohl für den IHC p16^{INK4a}- als auch für den HPV-DNA-Status positiv eingestuft wurde [86].

Die HPV-Charakterisierung der HNSCC-Primärtumore ergab 15 % HPV-positive Tumore im definitiven LMU-KKG-Patientenkollektiv, von denen 95 % HPV-16 assoziiert waren und es sich bei 79 % um Tumore des Oropharynx handelte. 23 % der Primärtumore des adjuvant strahlen(chemo)therapeutisch behandelten LMU-KKG-Kollektivs (2008-2013 behandelte Patienten) waren HPV-positiv, wobei es sich bei 87 % um Oropharynx-Tumore handelte und 83 % der HPV-positiven Tumore HPV-16 assoziiert waren [54].

Wie erwartet hatte der HPV-Status der Tumore einen signifikanten Einfluss auf die Prognose der Patienten nach erfolgter definitiver oder adjuvanter Strahlen(chemo)therapie. Die bessere Prognose HPV-positiver HNSCC-Patienten wurde für alle untersuchten Endpunkte (Gesamtüberleben, Rezidivfreiheit und lokoregionäre Kontrolle; Abbildung 1) deutlich.

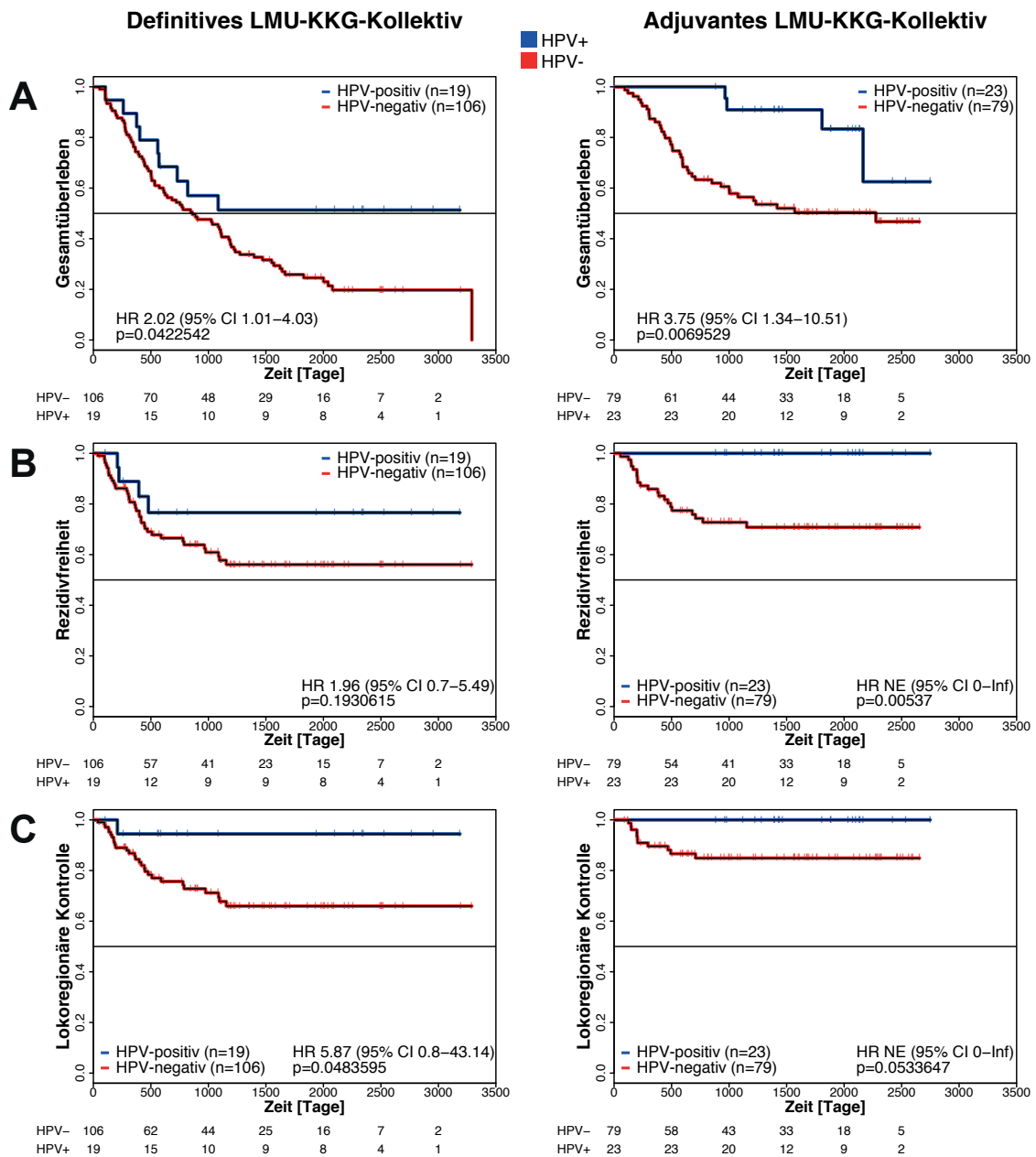


Abbildung 1: Einfluss des HPV-Status auf die Prognose von HNSCC-Patienten nach definitiver oder adjuvanter Strahlen(chemo)therapie.

Kaplan-Meier Kurven für die Endpunkte **(A)** Gesamtüberleben, **(B)** Rezidivfreiheit und **(C)** lokoregionäre Kontrolle (Zeit in Tagen) für die LMU-KKG-Kollektive definitiv und adjuvant strahlen(chemo)therapeutisch behandelter HNSCC-Patienten stratifiziert nach dem HPV-Status (HPV+: blau, HPV-: rot). Ein Primärtumor wurde für die Analysen als HPV-positiv gewertet, sofern er sowohl mittels p16-INK4A-Immunhistochemie als auch auf HPV-DNA-Ebene positiv klassifiziert wurde. Links: definitives LMU-KKG-Kollektiv (n = 125; HPV-positiv n = 19, HPV-negativ n = 106); rechts: adjuvantes LMU-KKG-Kollektiv 2008-2013 (n = 102; HPV-positiv n = 23, HPV-negativ n = 79). Die p-Werte wurden durch den Log-Rank-Test ermittelt. Hazard Ratios (HR) mit 95 % Konfidenzintervallen (CI) sind angegeben. NE = nicht einschätzbar. Inf = unendlich.

2.1.4 Multi-level Omics-Datengenerierung

Für die etablierten HNSCC-Kollektive wurden auf verschiedenen molekularen Ebenen hochdimensionale Omics-Datensätze mittels Mikroarray- und Next Generation Sequencing (NGS) Technologie generiert. Auf genomischer Ebene wurden DNA-Kopienzahlveränderungs- (Array-CGH), DNA-Methylierungs- sowie DNA-Exom- / DNA-Panel-Seq-Analysen durchgeführt. Darüber hinaus wurden RNA-seq- und miRNA-Mikroarray-Expressions-Datensätze generiert.

Die bislang wichtigsten Ergebnisse beziehen sich vor allem auf die Analysen des adjuvanten LMU-KKG-Kollektivs 2008-2013 behandelter Patienten, welche im Folgenden dargestellt sind.

2.2 Molekulare Aberrationen assoziiert mit dem HPV-Status

Wie bereits in zahlreichen Studien berichtet [20,22,46,49,56,75,80,87,90], zeigten die Analysen des LMU-KKG-Kollektivs adjuvant radio(chemo)therapeutisch behandelter HNSCC-Patienten auf verschiedenen molekularen Ebenen ausgeprägte Unterschiede in der molekularen Landschaft HPV-positiver Tumore (p16/HPV-DNA positiv, siehe Abschnitt 2.1.3).

In 100 primären HNSCC-Tumoren des retrospektiven adjuvanten LMU-KKG-Kollektivs wurde ein Panel von 91 tumorassoziierten Genen mittels NGS auf Mutationen untersucht. Es zeigten sich dem HPV-Status assoziierte DNA-Mutationsmuster (HPV-negative HNSCC: n = 77; HPV-positive HNSCC: n = 23). So traten beispielsweise TP53- und CDKN2A-Mutationen ausschließlich in HPV-negativen Tumoren auf (TP53: n = 60, 78 % der Fälle; CDKN2A: n = 11, 14 % der Fälle), wohingegen PIK3CA-Mutationen in 57 % (n = 13) der HPV-positiven und in lediglich 10 % (n = 8) der HPV-negativen HNSCC vorzufinden waren. Die Daten decken sich sehr gut mit bisherigen Veröffentlichungen [20,87,90].

HPV-negative und HPV-positive HNSCC-Primärtumore unterschieden sich auch hinsichtlich genomischer Kopienzahlaberrationen. 114 HNSCC des retrospektiven adjuvanten LMU-KKG-Kollektivs (HPV-negativ: n = 91, 79,8 % der Fälle; HPV-positiv: n = 23, 20,2 % der Fälle) wurden mittels Oligo-Mikroarray-basierter Comparative Genomic Hybridization (aCGH) Analysen hinsichtlich genomweiter Kopienzahlaberrationen charakterisiert. Hierbei wurden 28 DNA-Kopienzahlveränderungen identifiziert, die signifikant mit dem HPV-Status der Tumore assoziiert waren, von denen die meisten bereits beschrieben wurden [20,46,80]. So traten DNA-Zugewinne auf den Chromosomen 1p36, 8p23-12, 8p11, 10q26, 16p13, 16p11, 18q23, 19p13, 19q13 und 21q22 sowie DNA-Verluste der chromosomalen Bande 11q14-21 signifikant häufiger in HPV-positiven Fällen auf. Andererseits waren DNA-Zugewinne auf den Chromosomen 5p15-14, 5p13, 7p22-14, 9p21 und 11q13 sowie DNA-Verluste von 3p26-12, 9p24-13, 17p13-11, 18q12-23, 21q21 und 21q22 in HPV-negativen Fällen signifikant überrepräsentiert (Abbildung 2).

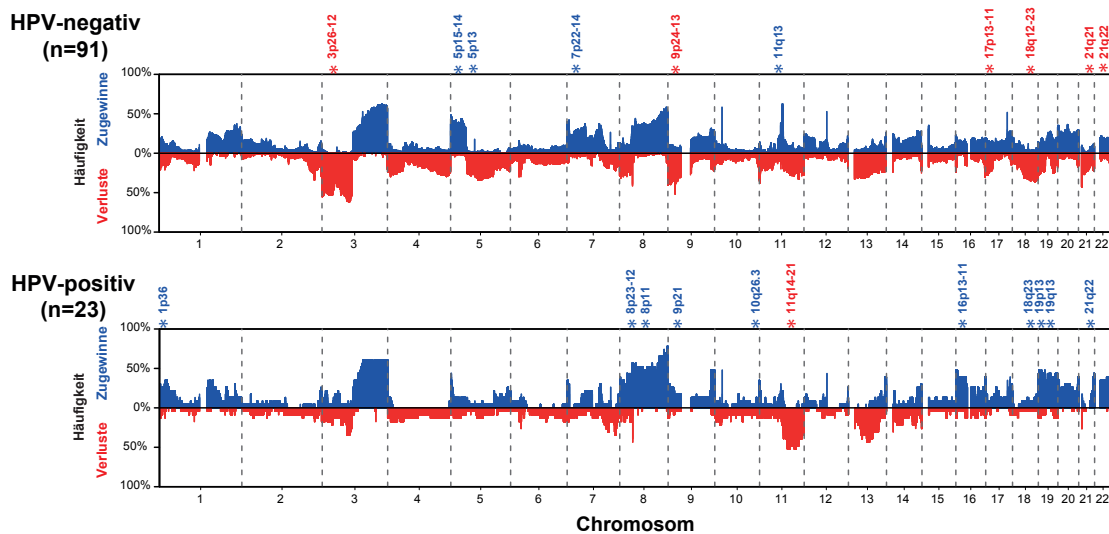


Abbildung 2: Gesamtgenomische Kopienzahlveränderungen in HPV-negativen und HPV-positiven HNSCC-Primärtumoren.

Häufigkeitsprofile von Kopienzahlveränderungen für 114 HNSCC-Primärtumore des LMU-KKG-Kollektivs von Patienten behandelt mit adjuvanter Radio(chemo)therapie stratifiziert nach dem HPV-Status (oben: HPV-negative HNSCC n = 91; unten: HPV-positive HNSCC n = 23). Die blauen Balken (von der Mitte nach oben aufgetragen) stellen die Häufigkeit (Anteil der Fälle in %) dar, die einen Kopienzahl-Zugewinn an der entsprechenden Stelle im Genom zeigt (aufgetragen entlang der Chromosomen 1-22 von pter nach qter), während die roten Balken (von der Mitte nach unten aufgetragen) die Häufigkeit der Kopienzahl-Verluste darstellen. Mit * gekennzeichnet sind Kopienzahlveränderungen, die signifikant häufiger in HPV-negativen oder HPV-positiven Tumoren auftraten.

Auch auf microRNA (miRNA) und mRNA-Ebene zeigten sich deutliche Expressionsunterschiede in Abhängigkeit vom HPV-Status der Tumore. Die globalen Mikroarray-basierten miRNA-Expressionsanalysen der beiden retrospektiven Patientenkollektive DTKK-ROG (Deutsches Konsortium für translationale Krebsforschung, Radiation Oncology Group; n = 128) und LMU-KKG (n = 102) adjuvant radio(chemo)therapierter HNSCC-Patienten ergaben die HPV-assoziierte Expression einer Reihe von miRNAs. Darüber hinaus konnte im DTKK-ROG-Kollektiv ein miRNA-Klassifikator bestehend auf 24 miRNAs gebildet werden, der den HPV-Status und das klinische Outcome der Patienten vorhersagt. Der Klassifikator wurde im LMU-KKG-Kollektiv unabhängig validiert [37]. Diese Arbeit ist unter 2.7 „Integration von p16/HPV-DNA-Status mit einem 24-miRNA-definierten molekularen Phänotyp“ zusammengefasst.

Auf mRNA-Expressionsebene wurden NGS-basierte Whole-RNA-Sequenzierungsanalysen von 76 HNSCC-Primärtumoren des retrospektiven adjuvanten LMU-KKG-Kollektivs durchgeführt. Die ersten Ergebnisse zur differentiellen Genexpression in Abhängigkeit vom HPV-Status zeigen in HPV-positiven Tumoren unter anderem die Überexpression von Genen, welche für die Karzinogenese HPV-induzierter Kopf-Hals-Tumore entscheidend sind. So wurde in HPV-positiven Tumoren die bereits beschriebene Überexpression Hodenspezifischer Gene (z. B. SYCP2 und STAG3) beobachtet [22,56,75]. Obwohl die SYCP2-Expression synergistisch durch die viralen Onkogene E6 und E7 hochreguliert wird, ist die STAG3-Expressionssteigerung kein unmittelbarer Effekt der Virusinfektion, sondern eine verzögerte, Passagen-abhängige Reaktion [22].

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse auf allen analysierten molekularen Ebenen ausgeprägte molekulare Unterschiede zwischen HPV-positiven und HPV-negativen HNSCC. Für HNSCC-Studien zur Identifikation prognostischer Marker ist eine Stratifizierung der Tumore hinsichtlich HPV-Status daher von großer Bedeutung, so dass sich unsere Analysen hauptsächlich auf HPV-negative HNSCC fokussierten.

2.3 Genomische Amplifikation von FancA und deren Einfluss auf die Radioresistenz beim HNSCC

Hess, J.; Unger, K.; Orth, M.; Schotz, U.; Schüttrumpf, L.; Zangen, V.; Gimenez-Aznar, I.; Michna, A.; Schneider, L.; Stamp, R.; Selmansberger, M.; Braselmann, H.; Hieber, L.; Drexler, G.A.; Kuger, S.; Klein, D.; Jendrossek, V.; Friedl, A.A.; Belka, C.; Zitzelsberger, H.; Lauber, K. Genomic amplification of Fanconi anemia complementation group A (FancA) in head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC): Cellular mechanisms of radioresistance and clinical relevance. **Cancer Lett** 2017, 386, 87-99, doi:10.1016/j.canlet.2016.11.014. (IF 6,491)

In einer früheren Studie konnte gezeigt werden, dass DNA-Zugewinne der chromosomalen Bande 16q24.3 mit einem schlechteren rezidivfreien Überleben der HNSCC-Patienten nach Strahlentherapie einhergehen, wobei das dort lokalisierte FancA-Gen als Kandidat für die Vermittlung von Radioresistenz in Kopf-Hals-Tumoren identifiziert wurde [8].

In der hier zusammengefassten Folgestudie konnten wir die Assoziation von genomischen Kopienzahl-Zugewinnen der chromosomalen Bande 16q24.3 (FancA-Lokus) mit erhöhten FancA-mRNA-Expressionsniveaus und reduziertem Gesamtüberleben in der Subgruppe strahlentherapeutisch behandelter Patienten des The Cancer Genome Atlas (TCGA) HNSCC-Kollektivs [20] validieren, was auf eine Beteiligung von FancA bei strahlentherapeutischem Versagen hindeutet (Abbildung 3A-B) [39]. Die Hypothese wurde durch mechanistische *in vitro* Analysen bekräftigt, in denen eine Rolle von FancA bei der Vermittlung der zellulären Strahlenresistenz gezeigt werden konnte (Abbildung 3C) [15,39]. Interessanterweise war die FancA-vermittelte Strahlenresistenz nicht mit einer Hyperaktivierung des klassischen Fanconi-Anemia/BRCA-Wegs der DNA-Schadensreparatur assoziiert. Stattdessen konnte nach FancA-Überexpression in humanen immortalisierten Keratinozyten eine Herunterregulierung des Interferon-Signallings, eine verstärkte strahlungsinduzierte Seneszenz und die erhöhte Produktion des Seneszenz-assoziierten sekretorischen Phänotyps (SASP) gezeigt werden (Abbildung 3D). In zwei weiteren Projekten an einem Panel von HNSCC-Zelllinien sowie an HNSCC-Zellsubklonen, die sich in ihrer Strahlenempfindlichkeit unterscheiden, wurde der SASP auch als sehr wichtig für den strahlenresistenten Phänotyp identifiziert [57,58,78].

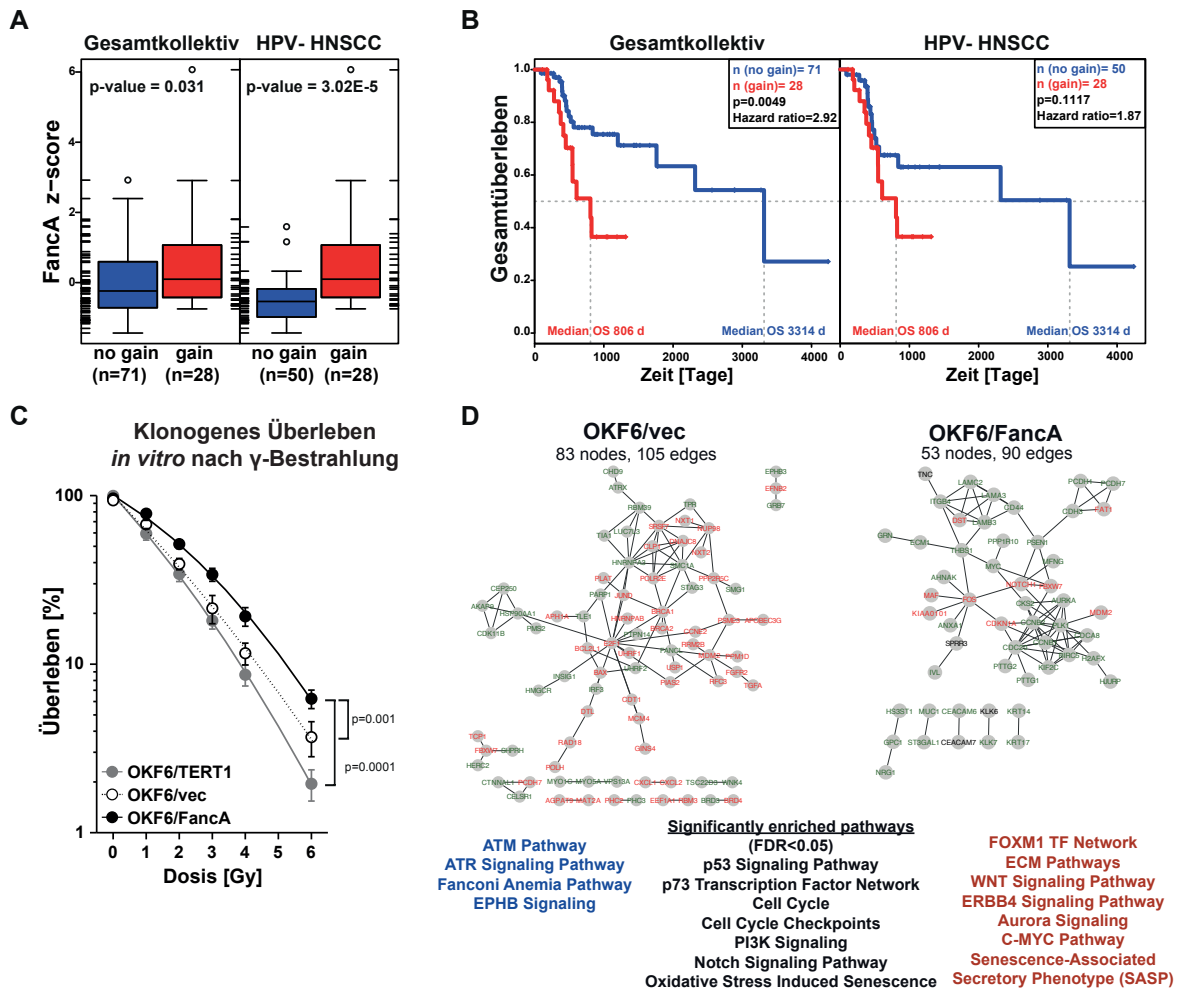


Abbildung 3: Genomische Amplifikation von FancA in HNSCC und deren Einfluss auf die Strahlenresistenz.

Analyse der Subgruppe adjuvant strahlentherapeutisch behandelter Fälle des TCGA-HNSCC-Kollektivs im Gesamtkollektiv (n = 99) und stratifiziert auf HPV-negative HNSCC-Fälle (n = 78): **(A)** Assoziation von DNA-Zugewinnen der chromosomalen Bande 16q24.3 (FancA-Lokus) mit erhöhten FancA-mRNA-Expressionsniveaus und **(B)** verringertem Gesamtüberleben, wie in den Kaplan-Meier-Kurven für HNSCC-Patienten mit oder ohne DNA-Zugewinn von 16q24.3 dargestellt. **(C)** Die Überexpression von FancA in immortalisierten Keratinozyten (OKF6/FancA) führte zu einem signifikant erhöhten klonogenen Überleben nach *in vitro* γ -Bestrahlung im Vergleich zu Vektor-Kontrollzellen (OKF6/vec) und Parentalzellen (OKF6/TERT1). **(D)** Es wurden gemeinsame und distinkte Signalwege identifiziert, die an der Strahlenantwort FancA-überexprimierender Zellen und Vektorkontrollzellen beteiligt sind. Gezeigt sind die generierten Interaktionsnetzwerke differenziell exprimierter Gene nach 4 Gy γ -Bestrahlung in OKF6/vec (links) und FancA-überexprimierenden Zellen (rechts). Hochregulierte Gene sind rot, herunterregulierte Gene grün markiert. Signifikant überrepräsentierte Signalwege, die in beiden Zelllinien vorkommen, sind in der Mitte der Abbildung aufgeführt. Nach Bestrahlung exklusiv veränderte Signalwege in OKF6/vec und OKF6/FancA Zellen sind blau bzw. rot dargestellt. Abbildung modifiziert nach [39].

2.4 Prognostische Vier-Gen-Expressions-Signatur 16q24.3 lokalisierter Gene

Wintergerst, L.; Selmansberger, M.; Maihoefer, C.; Schüttrumpf, L.; Walch, A.; Wilke, C.; Pitea, A.; Woischke, C.; Baumeister, P.; Kirchner, T.; Belka, C.; Ganswindt, U.; Zitzelsberger, H.; Unger, K.; **Hess, J.** A prognostic mRNA expression signature of four 16q24.3 genes in radio(chemo)therapy-treated head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC). *Mol Oncol* **2018**, *12*, 2085-2101, doi:10.1002/1878-0261.12388. (IF: 5,962)

Der prognostische Wert von DNA-Zugewinnen des FancA-Lokus auf Chromosom 16q24.3 wurde weiter untersucht [8,101]. Um eine prognostische Gen-Expressions-Signatur bestehend aus 16q24.3-lokalisierten Genen zu identifizieren, wurde ein Forward-Selection-Ansatz auf die mRNA-Genexpressionsdaten des TCGA-Subkollektivs strahlentherapeutisch behandelter HNSCC-Patienten (n = 99) angewandt (Abbildung 4A) [20]. Der Datensatz wurde zufällig in einen Trainings- (n = 40) und einen Validierungs-Datensatz (n = 59) aufgeteilt, wobei auf eine gleichmäßige Verteilung HPV-positiver und HPV-negativer Tumore geachtet wurde. Das beste Cox-Proportional Hazard-Modell umfasste die vier Gene APRT, CENPBD1, CHMP1A und GALNS (Abbildung 4B, links) [101]. Basierend auf den Expressionsniveaus der Gene und gewichtet mit den jeweiligen Cox-Proportional Hazard-Koeffizienten, wurde für jeden Patienten ein individueller Risiko-Score berechnet. Die Patienten wurden mit dem optimalen Gruppen-auftrennenden Schwellenwert in eine Gruppe mit geringem Risiko und hohem Risiko eingeteilt (Endpunkt Gesamtüberleben). Der gleiche Risiko-Score-Wert wurde als Schwellenwert auf die Expressionsdaten des TCGA-Validierungs-Datensatz angewandt, wodurch der prognostische Wert des Vier-Gen-Klassifikators bestätigt wurde (HR = 3,85, 95% CI 1,05-13,89; p = 0,029). Darüber hinaus konnte die Vier-Gen-Expressions-Signatur im retrospektiven LMU-KKG-Kollektiv adjuvant strahlen(chemo)therapeutisch behandelter HNSCC-Patienten (n = 108) mittels qRT-PCR-Analysen unabhängig validiert werden (Abbildung 4B, rechts).

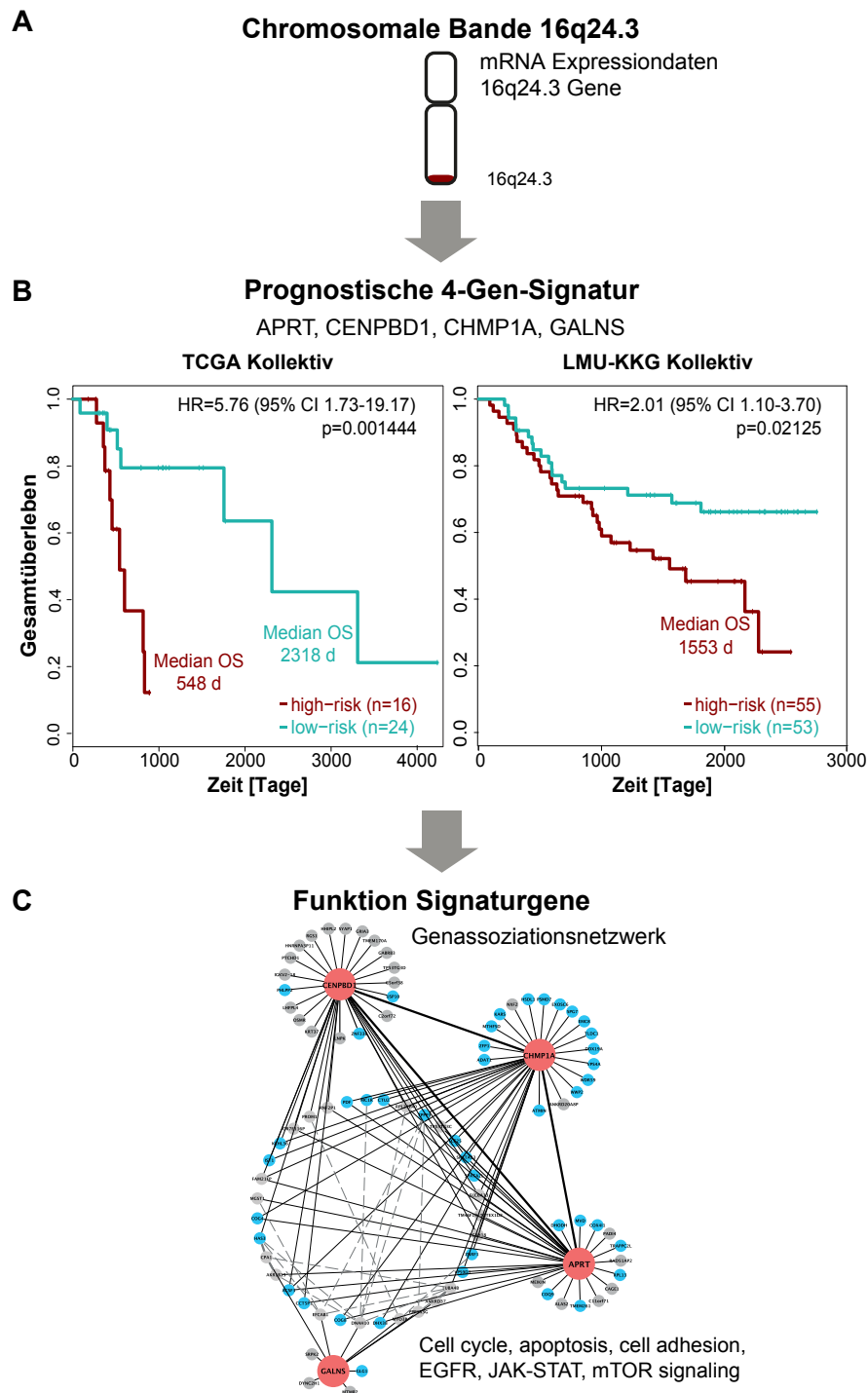


Abbildung 4: Prognostische Vier-Gen-Expressions-Signatur 16q24.3-lokalisierter Gene

(A) Um eine prognostische Gen-Expressions-Signatur bestehend aus 16q24.3-lokalisierten Genen zu identifizieren, wurde ein Forward-Selection-Ansatz auf die mRNA-Genexpressionsdaten des TCGA-Subkollektivs strahlentherapeutisch behandelter HNSCC-Patienten ($n = 99$) angewandt. (B) Kaplan-Meier-Kurven für den Endpunkt Gesamtüberleben von Patienten, die gemäß des identifizierten Vier-Gen-Klassifikators (APRT, CENPBD1, CHMP1A und GALNS) in Hochrisiko- und Niedrigrisiko-Patienten stratifiziert sind in der Subgruppe

strahlentherapeutisch behandelter HNSCC-Patienten des TCGA-Kollektivs (Trainings-Datensatz). Unabhängige Validierung der Vier-Gen-Expressions-Signatur im LMU-KKG-Kollektiv adjuvant strahlen(chemo)therapeutisch behandelter HNSCC-Patienten ($n = 108$). Die p-Werte wurden durch den Log-Rank-Test ermittelt. Hazard Ratios (HR) mit 95 % Konfidenzintervallen (CI) und medianen Überlebenszeiten sind angegeben. **(C)** Erstes Nachbarschaftsnetzwerk der vier Signaturgene (in rot), extrahiert aus dem Genassoziationsnetzwerk (GAN), welches basierend auf einer partiellen Korrelation differenziell exprimierter Gene zwischen Hochrisiko- und Niedrigrisiko-Patienten des TCGA-HNSCC-Kollektivs ($n = 98$) mit Hilfe der GeneNet-Methode rekonstruiert wurde. Gepunktete graue Linien verknüpfen die ersten Nachbarschaftsgene von GALNS mit den ersten Nachbarschaftsgenen der anderen drei Signaturgene. Auf 16q-lokalisierte Gene sind cyan eingefärbt. Überrepräsentierte Signalwege sind aufgeführt. Abbildung modifiziert nach [101].

Dabei zeigten Hochrisiko-Patienten ein signifikant schlechteres Gesamtüberleben (HR = 2,01, 95% CI 1,10-3,70; $p = 0,021$), rezidivfreies Überleben (HR = 1,84, 95 % CI 1,01-3,34; $p = 0,042$) und lokoregionäres-rezidivfreies Überleben (HR = 1,87, 95 % CI 1,03-3,40; $p = 0,036$). Auch nach Berücksichtigung des HPV-Status in der multivariaten Analyse behielt der Vier-Gen-Klassifikator seinen unabhängigen prognostischen Wert.

Erste Erkenntnisse über die funktionelle Rolle der vier Signaturgene wurden durch die Rekonstruktion eines Genassoziationsnetzwerks (GAN) aus Transkriptomdaten der strahlentherapeutisch behandelten Subgruppe des TCGA HNSCC-Kollektivs mit Hilfe eines partiellen Korrelationsansatzes gewonnen. Die Analyse der Anreicherung von Signalwegen in der ersten und zweiten Nachbarschaft der Signaturgene deutet auf die Beteiligung krebsbezogener Prozesse wie Apoptose, Zellzyklus und Zelladhäsion sowie verschiedener HNSCC-assoziiierter Signalwege (z. B. EGFR, JAK-STAT, mTOR Signalweg) hin (Abbildung 4C).

2.5 Prognostische Fünf-miRNA-Signatur in HPV-negativen HNSCC

Hess, J.; Unger, K.; Maihoefer, C.; Schüttrumpf, L.; Wintergerst, L.; Heider, T.; Weber, P.; Marschner, S.; Braselmann, H.; Samaga, D.; Kuger, S.; Pflugradt, U.; Baumeister, P.; Walch, A.; Woischke, C.; Kirchner, T.; Werner, M.; Werner, K.; Baumann, M.; Budach, V.; Combs, S.E.; Debus, J.; Grosu, A.L.; Krause, M.; Linge, A.; Rodel, C.; Stuschke, M.; Zips, D.; Zitzelsberger, H.; Ganswindt, U.; Henke, M.; Belka, C. A Five-MicroRNA Signature Predicts Survival and Disease Control of Patients with Head and Neck Cancer Negative for HPV Infection. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research* 2019, 25, 1505-1516, doi:10.1158/1078-0432.CCR-18-0776. (IF 10,107)

MiRNAs weisen bei den meisten Krebsarten ein hohes Maß an Deregulierung auf und sind vielversprechend für die Entwicklung von prognostischen oder prädiktiven Markern [5,41]. Zahlreiche Studien berichteten bereits aberrant exprimierte miRNAs in HNSCC – teilweise mit prognostischer Relevanz – und deren mögliche klinische Bedeutung [42,47,81]. Bisher hat jedoch noch keine Studie die prognostische Rolle von miRNAs mittels globalen miRNA-Expressionsanalysen in gut charakterisierten und hinsichtlich HPV-Status stratifizierten HNSCC-Kollektiven untersucht. Die beiden unabhängigen retrospektiven HNSCC-Kollektive DTK-ROG (Deutsches Konsortium für translationale Krebsforschung, Radiation Oncology Group) und LMU-KKG adjuvant strahlentherapeutisch behandelter Patienten wurden globalen miRNA-Expressionsanalysen unterzogen. Ziel war die Identifizierung eines prognostischen miRNA-Klassifikators mittels Forward-Selection-Ansatz, der es erlaubt, das Rezidivrisiko HPV-negativer HNSCC-Patienten nach erfolgter adjuvanter Strahlen(chemo)therapie vorherzusagen. Da HNSCC-Patienten oft an weiteren Komorbiditäten leiden, die auch das Gesamtüberleben beeinträchtigen, wurde Rezidivfreiheit (lokoregionäres und / oder distantes Versagen) als geeigneter Endpunkt für die Signaturentwicklung gewählt [70].

Im multizentrischen DTK-ROG-Kollektiv (n = 85) konnte eine Fünf-miRNA-Signatur (hsa-let-7g-3p, hsa-miR-6508-5p, hsa-miR-210-5p, hsa-miR-4306 und hsa-miR-7161-3p) identifiziert werden, die eine Patienten-Stratifizierung in Gruppen mit niedrigem oder hohem Rezidivrisiko ermöglicht [38]. Der Klassifikator wurde im monozyentrischen LMU-KKG-Kollektiv (n = 77; HR 4,24, 95 % CI 1,4-12,81, p = 0,0054) validiert (Abbildungen 5A-B).

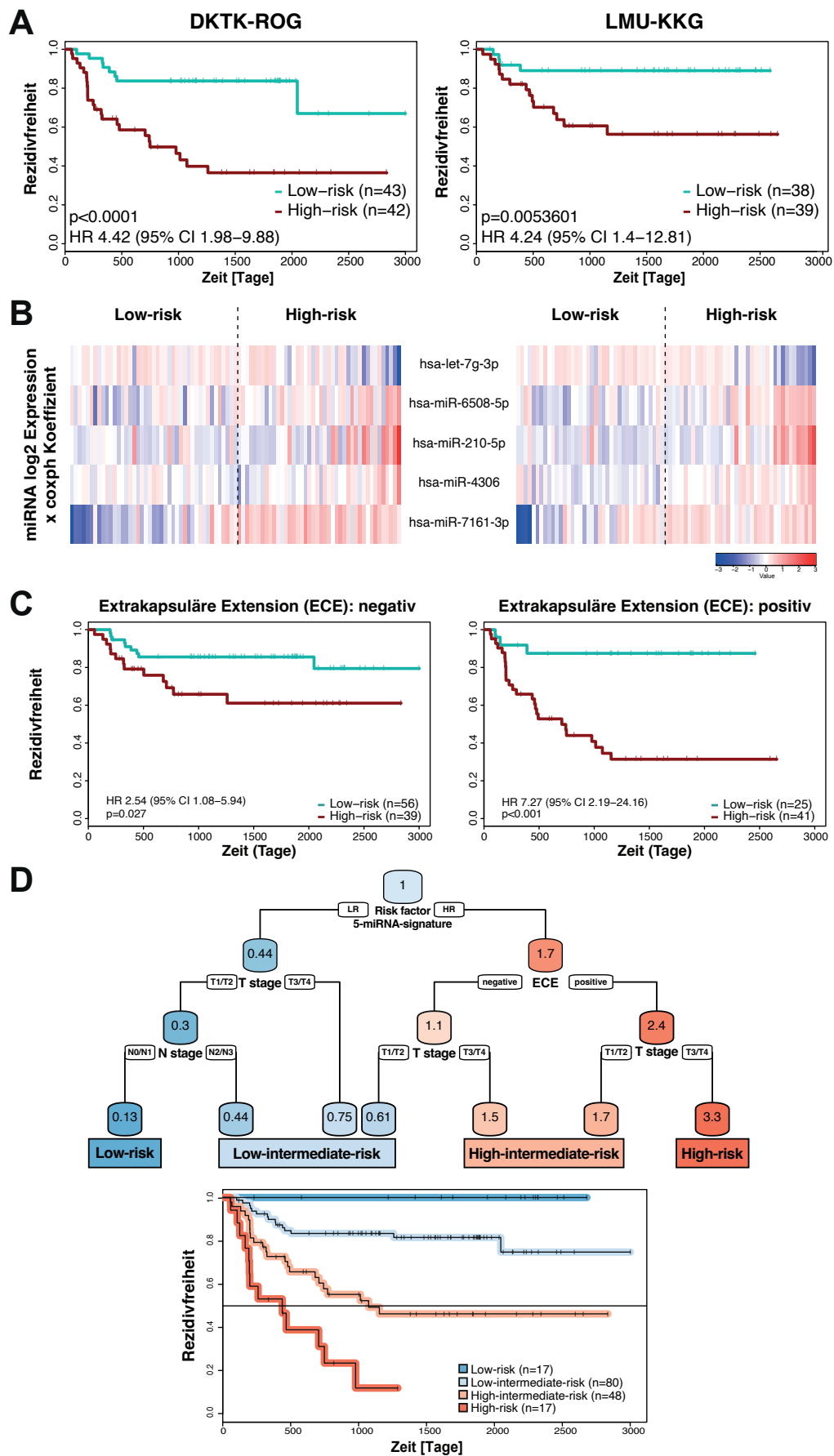


Abbildung 5: Fünf-miRNA-Signatur, die das Rezidivrisiko HPV-negativer HNSCC-Patienten nach erfolgter adjuvanter Strahlen(chemo)therapie prognostiziert.

(A) Kaplan-Meier-Kurven für den Endpunkt Rezidivfreiheit für HPV-negative HNSCC-Patienten des Trainings- (DKTK-ROG-Kollektiv: n = 85, linkes Panel) und des Validierungs-Datensatzes (LMU-KKG-Kollektiv: n = 77, rechtes Panel), stratifiziert in Patienten mit niedrigem (low-risk) und hohem Risiko (high-risk) mit Hilfe des Fünf-miRNA-Klassifikators. Die p-Werte wurden durch den Log-Rank-Test ermittelt. Hazard Ratios (HR) mit 95 % Konfidenzintervallen (CI) sind angegeben. **(B)** Heatmap mit skalierten miRNA-Log2-Expressionswerten gewichtet mit dem jeweiligen Cox-Proportional Hazard-Koeffizient (Coxph) von niedrig (blau) bis hoch (rot) auf einer Skala von -3 bis 3 für jede der fünf Signatur-miRNAs im Trainings- (linkes Panel) und Validierungs-Datensatz (rechtes Panel). Für jeden Patienten wurde ein Risiko-Score berechnet, indem die Summe der Expressionswerte der fünf miRNAs gewichtet mit dem jeweiligen Cox-Proportional Hazard-Koeffizient gebildet wurde. Der Median-Risiko-Score der Patienten im Trainings-Datensatz wurde als Cut-Off für die Definition von high-Risk (Risiko-Score > Median-Risiko-Score) und low-Risk (Risiko-Score ≤ Median-Risiko-Score) für alle Fälle verwendet. **(C)** Sub-Stratifizierung des gepoolten HNSCC-Patientenkollektivs (n=162) in ECE-negative (extrakapsuläre Extension, links) und -positive (rechts) Tumore mit Hilfe des Fünf-miRNA-Klassifikators in Patienten mit niedrigem (low-risk) und hohem Risiko (high-risk). **(D)** Sub-Stratifizierung des gepoolten HNSCC-Patientenkollektivs (n=162) in vier prognostisch signifikant unterschiedliche Risikogruppen, identifiziert mittels rekursiver Partitionsanalyse (RPA). RPA-Baum und Risikogruppen für das Auftreten von Rezidiven: Kombination der Parameter Fünf-miRNA-Signatur (high-risk, low-risk), ECE (negativ - einschließlich N0-Tumore, positiv), T-Stadium (T1/T2, T3/T4) und N-Stadium (N0/N1, N2/N3) im gepoolten HNSCC-Datensatz (n = 162). Jeder Knoten zeigt das vorhergesagte Risiko für das Auftreten eines Rezidivs im Vergleich zum Gesamtkollektiv an (lokoregionäres und/oder distantes Versagen; Farbcode niedriges bis hohes Risiko: blau-rot). Kaplan-Meier-Kurven für die vier identifizierten Risikogruppen "low-risk", "low-intermediate-risk", "high-intermediate-risk" und "high-risk" für den Endpunkt Rezidivfreiheit. Abbildung modifiziert nach [38].

Neben dem primären Endpunkt Rezidivfreiheit, zeigten Hochrisikopatienten beider Kollektive ein signifikant verkürztes rezidivfreies Überleben, Gesamtüberleben und krankheitsspezifisches Überleben. Nach Berücksichtigung relevanter Co-Variablen in multivariaten Cox-Regressionsanalysen behielt der Fünf-miRNA-Klassifikator als einziger Parameter seine prognostische Bedeutung bei (DKTK-ROG: HR 5,55, 95 % CI 2,09-14,79, p = 0,0006; LMU-KKG: HR 3,94, 95 % CI 1,23-12,59, p = 0,021).

Darüber hinaus wurden alle klinischen Endpunkte mit Hilfe der Fünf-miRNA-Signatur im Vergleich zu klinisch relevanten prognostischen Parametern wie knapper/positiver mikroskopischer Resektionsrand, extrakapsuläre Extension, perineurale Invasion oder lymphovaskuläre Invasion besser vorhergesagt.

Die Fünf-miRNA-Signatur wurde technisch mittels qRT-PCR im Validierungs-Datensatz (LMU-KKG) validiert. Es wurde ein miRNA-mRNA-Target-Netzwerk mit experimentell validierten miRNA-Zielgen-Interaktionen generiert. Die Analyse der beteiligten Signalwege ergab eine signifikante Anreicherung der Signalwege p53, ATM, FoxO, DNA-Doppelstrangbruch-Antwort, pre-NOTCH-Expression und -Prozessierung, Mitose und Seneszenz-assoziierte Signalwege.

Mehrere der Signalwege und miRNA-Zielgene wurden bereits in Zusammenhang mit der Pathogenese und Strahlenantwort des HNSCC beschrieben [1,20,39,52,58,87,88,93,104]. Beispielsweise sind Mutationen von IGF1R und ARID1A und die Beteiligung von CADM1 und SOD2 im HNSCC bekannt [20,52,93,104], so dass die identifizierten miRNAs möglicherweise eine Rolle bei der Tumorentstehung und Progression von HNSCC spielen könnten.

In einer Kaplan-Meier-Analyse, in der die Kollektivproben gepoolt (n=162) und nach den Parametern Resektionsstatus, TNM T-Stadium, TNM N-Stadium, extrakapsuläre Extension (ECE) und Tumorlokalisation stratifiziert wurden, unterschieden sich die resultierenden fünf miRNA-Signatur-Risikogruppen signifikant im klinischen Verlauf (siehe am Beispiel für ECE in Abbildung 5C).

Die Kombination der Fünf-miRNA-Signatur mit den klinisch etablierten Risikofaktoren extrakapsuläre Extension, TNM T-Stadium und TNM N-Stadium im Gesamtkollektiv erlaubte darüber hinaus die Sub-Stratifizierung der Patienten in vier prognostisch signifikant unterschiedliche Gruppen („low-risk“, n = 17; „low-intermediate-risk“, n = 80; „high-intermediate-risk“, n = 48; „high-risk“, n = 17; $p < 0.001$; Abbildung 5D). Der Fünf-miRNA-Klassifikator könnte nach Validierung in unabhängigen HNSCC-Patientenkollektiven daher bei HPV-negativen HNSCC im Rahmen von Standardbehandlungen als diagnostisches Instrument zur Identifizierung von Patienten mit hohem oder niedrigem Rezidivrisiko eingesetzt werden und bietet eine mögliche Grundlage für individuellere Behandlungsentscheidungen stratifizierter Patientengruppen. Mögliche personalisierte Behandlungsmöglichkeiten sind in erster Linie die Anpassung der Therapieintensität an das Gesamtrisiko eines Therapieversagens – z. B. Dosisreduktion bei Patienten mit niedrigem Risiko oder bei Hochrisiko-Patienten die Zugabe zielgerichteter Medikamente oder Immun-Checkpoint-

Inhibitoren zusätzlich zur Radio(chemo)therapie, Dosisescalation oder zusätzliche adjuvante Chemotherapie. Darüber hinaus stellt die Fünf-miRNA-Signatur die Grundlage für eine gezieltere Suche nach molekularen therapeutischen Targets dar, die den Therapieerfolg für geeignete Patientengruppen verbessern könnten.

2.6 Therapieassoziierte molekulare Subtypen beim primären und rezidierten HNSCC

Weber, P.*; Kunstner, A.*; **Hess, J.***; Unger, K.*; Marschner, S.; Idel, C.; Ribbat-Idel, J.; Baumeister, P.; Gires, O.; Walz, C.; Rietzler, S.; Valeanu, L.; Herkommer, T.; Kreutzer, L.; Klymenko, O.; Drexler, G.; Kirchner, T.; Maihofer, C.; Ganswindt, U.; Walch, A.; Sterr, M.; Lickert, H.; Canis, M.; Rades, D.; Perner, S.; Berriel Diaz, M.; Herzig, S.; Lauber, K.; Wollenberg, B.; Busch, H.; Belka, C.; Zitzelsberger, H. Therapy-Related Transcriptional Subtypes in Matched Primary and Recurrent Head and Neck Cancer. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research* 2022, 28, 1038-1052, doi:10.1158/1078-0432.CCR-21-2244. *geteilte Erstautorenschaft (IF 11,5)

Die genetische Verwandtschaft primärer und rezidivierter Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereichs (HNSCC) spiegelt das Ausmaß an Tumorerheterogenität und therapiegetriebener Selektion von Tumor-Subpopulationen wider. Ziel der Studie war es, gepaarte Primär- und Rezidivtumore zu charakterisieren, um neue Erkenntnisse über die Entstehung von Rezidiven zu gewinnen.

Es wurden 150 HNSCC strahlentherapierter Patienten untersucht: 74 primäre HNSCC des adjuvanten LMU-KKG-Kollektivs 2008-2013 wurden einer RNA-Sequenzierung unterzogen. Von 38 gepaarten Primärtumoren und nach Strahlentherapie im Hochdosis-Feld entstandenen lokoregionären Rezidiven wurden Exom- und RNA-Sequenzierungen durchgeführt. Die vorherrschenden klassischen (CL), basalen (BA) und entzündlich-mesenchymalen (IMS) Transkriptionssubtypen wurden gemäß einer etablierten Klassifizierung bestimmt [46] sowie genomische Veränderungen und die klonale Zusammensetzung der Tumore analysiert [99].

Der BA-Subtyp, welcher Merkmale der partiellen epithelial-mesenchymalen Transition (p-EMT) aufweist, trat bei lokoregionären Rezidiven häufiger auf und war stabiler. In 44 % der gepaarten HNSCC änderte sich der dominante Subtyp vom Primär- zum Rezidivtumor, vorzugsweise von IMS zu BA oder CL (Abbildung 6C).

Eine differenzielle Genexpressionsanalyse (DGE) mit anschließender gene set enrichment Analyse (GSEA) zwischen Rezidiv- und Primärtumoren (n = 34 Patienten / 68 Proben) zeigte eine Herunterregulierung des PD1-Signalwegs sowie eine Anreicherung von DNA-Reparatur- und Stoffwechselprozessen in Rezidiven.

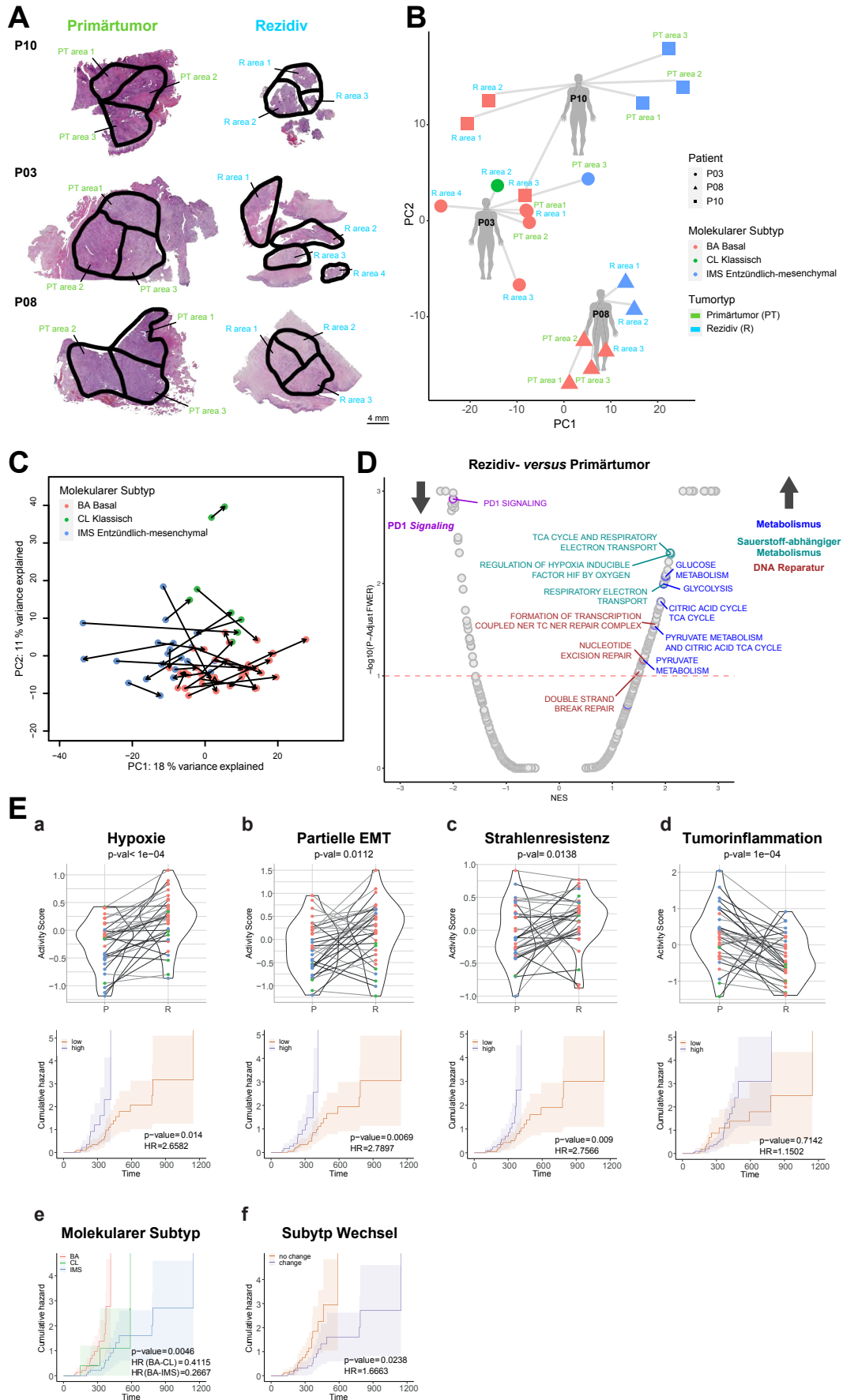


Abbildung 6: Vergleich des Transkriptomts zwischen HNSCC Primärtumoren und Rezidiven

Transkriptomische Tumorheterogenität von verschiedenen Tumorarealen gematchter primärer und rezidivierter HNSCC-Gewebeproben. **(A)** Verschiedene Tumorareale ($n = 19$) aus drei ausgewählten, gematchten primären und lokal rezidivierten HNSCC-Gewebeproben wurden mikroskopisch definiert. Eine histomorphologische Heterogenität war weder zwischen Rezidiv und Primarius noch zwischen individuell definierten Tumorarealen sichtbar. **(B)** Die 3'RNA-seq-Analyse ergab in der Hauptkomponentenanalyse (PCA) eine Heterogenität der zugeordneten Transkriptionssubtypen in verschiedenen Tumorbereichen eines FFPE-Tumorblocks für einen Primärtumor und zwei rezidivierte Tumorknoten sowie eine Stabilität des vorherrschenden Subtyps. **(C)** Transkriptionelle Subtypen von Primär- und Rezidivtumoren nach Keck et al. [46] Die mRNA-Sequenzierung wurde an gematchten Primär-/Rezidivtumorknoten durchgeführt. PCA der vorherrschenden transkriptionellen Subtypen von primären und rezidivierenden Tumorknoten ($n = 34$ Patienten / 68 Proben), die entweder eine geringe oder eine hohe Übereinstimmung aufweisen, was aus den Balkenlängen ersichtlich ist, die primäre und rezidivierende Tumorknoten verbinden. Bei 15 Tumorknoten änderte sich der Transkriptionssubtyp zwischen Primärtumor und Rezidiv. 19 Tumorknoten behielten den ursprünglichen Subtyp bei. **(D)** Differenzielle Genexpressionsanalyse (DGE) und gene set enrichment Analyse (GSEA) zwischen Rezidiv- und Primärtumoren ($n = 34$ Patienten / 68 Proben). Die GSEA zeigt eine Herunterregulierung des PD1-Signalwegs sowie eine Anreicherung von DNA-Reparatur- und Stoffwechselprozessen in Rezidiven. **(E)** Assoziation von transkriptionellen Subtypen mit Gensignaturen. Oben: Paarweise Vergleiche zwischen primären und rezidivierenden Tumorknoten ($n = 34$ Patienten / 68 Proben) für die Aktivitätswerte der prognostischen Signaturen für (a) Hypoxie, (b) partielle EMT, (c) Strahlenresistenz und (d) Tumorentzündung. P-Werte $< 0,05$ zeigen signifikant unterschiedliche Aktivitätswerte zwischen Tumorknoten an. Unten: Kaplan-Meier-Analyse, die die Entwicklung von Tumorexzidiven in Abhängigkeit von der Zeit (Tage) und den Aktivitätsscores für jede prognostische Signatur (a-d) darstellt. (e) Die Kaplan-Meier-Analyse (lokalregionäre Rezidive) zeigt auch signifikant unterschiedliche Latenzen für transkriptionelle Subtypen ($n = 34$ Primärtumore; BA $n = 16$, CL $n = 3$, IMS $n = 15$) und (f) eine längere Latenz für Subtyp-Wechsler (Primärtumore mit Subtypwechsel $n = 15$; ohne Subtypwechsel $n = 19$). Abbildung modifiziert nach [100].

Die Analyse prognostischer Gen-Sets ergab eine stärkere Aktivität von Hypoxie, partieller EMT (p-EMT) und Strahlentherapieresistenz-Signaturen sowie eine reduzierte Tumorentzündung in Rezidiven im Vergleich zu Index-Tumoren (Abbildung 6E, a-d). Bei hoher Aktivität von Hypoxie, partieller EMT und Strahlenresistenz zeigte sich eine signifikant kürzere Latenzzeit bis zur Rezidivierung (Abbildung 6E, a-d). Der BA-Subtyp wies, im Vergleich zum CL oder IMS-Subtyp, die kürzeste Latenzzeit für die Entwicklung eines Rückfalls auf. Tumore, die als Subtyp-Wechsler betrachtet wurden, hatten im Vergleich zu den Nicht-Wechslern eine signifikant

längere Latenzzeit bis zur Rezidiv-Entstehung, was auf komplexe Prozesse der transkriptionellen Umprogrammierung und/oder der Auswahl von Subklonen durch die Strahlentherapie schließen lässt (Abbildung 6, e-f).

Auf genomischer Ebene zeigte der Vergleich der SNVs der Top 20 Gene durchschnittlich 29 % singuläre Mutationen, die auf ein hohes Maß an Heterogenität zwischen Primär- und Rezidivtumoren hinweisen. Bei einer Untergruppe von Primär-/Rezidivtumorkombinationen gab es keine Hinweise auf einen gemeinsamen klonalen Ursprung. Im Vergleich zu Primärtumoren zeigte sich in Rezidiven eine tendenziell erhöhte chromosomale Instabilität und Ploidie sowie eine signifikant erhöhte Rate an Subklonen. Bei 57 % der Tumorkombinationen wurde eine klonale Expansion beobachtet, was auf eine mögliche Therapie-assoziierte, klonale Selektion von Subklonen hinweist.

Das hohe Maß an genetischer und transkriptioneller Heterogenität zwischen Primär- und Rezidivtumoren lässt auf eine therapieassoziierte Selektion eines transkriptionellen Subtyps mit therapeutisch ungünstigen Eigenschaften schließen. Für eine Optimierung der Behandlungsstrategien sollten deshalb die molekularen Profile der Rezidive anstelle der Primärtumoren herangezogen werden.

2.7 Integration von p16/HPV-DNA-Status mit einem 24-miRNA-definierten molekularen Phänotyp

Hess, J.; Unger, K.; Maihoefer, C.; Schüttrumpf, L.; Weber, P.; Marschner, S.; Wintergerst, L.; Pflugradt, U.; Baumeister, P.; Walch, A.; Woischke, C.; Kirchner, T.; Werner, M.; Sorensen, K.; Baumann, M.; Tinhofer, I.; Combs, S.E.; Debus, J.; Schafer, H.; Krause, M.; Linge, A.; von der Grun, J.; Stuschke, M.; Zips, D.; Canis, M.; Lauber, K.; Ganswindt, U.; Henke, M.; Zitzelsberger, H.; Belka, C. Integration of p16/HPV DNA Status with a 24-miRNA-Defined Molecular Phenotype Improves Clinically Relevant Stratification of Head and Neck Cancer Patients. *Cancers (Basel)* **2022**, *14*, doi:10.3390/cancers14153745. (IF 5,2)

Wie bereits zuvor beschrieben, zeichnen sich HPV-assoziierte HNSCC durch eine deutlich günstigere Prognose nach erfolgter Radio(chemo)therapie aus. Ziel dieser Studie war die Identifizierung einer miRNA-Signatur für die spezifische Erkennung HPV-assoziiierter HNSCC sowie die Charakterisierung der zugrundeliegenden molekularen Pathogenese durch Integration mit der Transkriptomebene. Hierzu wurde ein p16/HPV-DNA charakterisiertes multizentrisches (DKTK-ROG, Deutsches Konsortium für translationale Krebsforschung, Radiation Oncology Group; n = 128) und ein unabhängiges monozentrische Kollektiv (LMU-KKG-Kollektiv, n = 101) adjuvant strahlen(chemo)therapeutisch behandelter HNSCC-Patienten mittels globaler miRNA- und mRNA-Expressionsanalysen untersucht [37]. Die globalen Mikorarray-basierten miRNA-Expressionsanalysen der beiden retrospektiven Patientenkollektive (n = 229) ergab insgesamt 1031 exprimierte miRNAs und n = 55 differentiell exprimierte miRNAs (FDR < 0,05) in HPV-positiven (n = 61) gegenüber HPV-negativen Tumoren (n = 168), wobei 37 miRNAs herunterreguliert und 18 hochreguliert waren.

Im multizentrischen DKTK-ROG-Kollektiv (n = 128; HPV-negativ n = 90, HPV-positiv n = 38) wurde ein lineares Regressionsmodell zur Vorhersage des HPV-Status (p16/HPV-DNA) mittels Lasso-Regression generiert und im LMU-KKG-Kollektiv (n=101; HPV-negativ n = 78, HPV-positiv n = 23) getestet. Eine 24-miRNA-Signatur bestimmte den HPV-Status mit einer Vorhersagegenauigkeit von 94,53 % (AUC: 0,99; Spezifität 96,67 %, Sensitivität 89,47 %) in DKTK-ROG und 86,14 % (AUC: 0,86; Spezifität 89,74 %, Sensitivität 73,91 %) in LMU-KKG (Abbildung 7A).

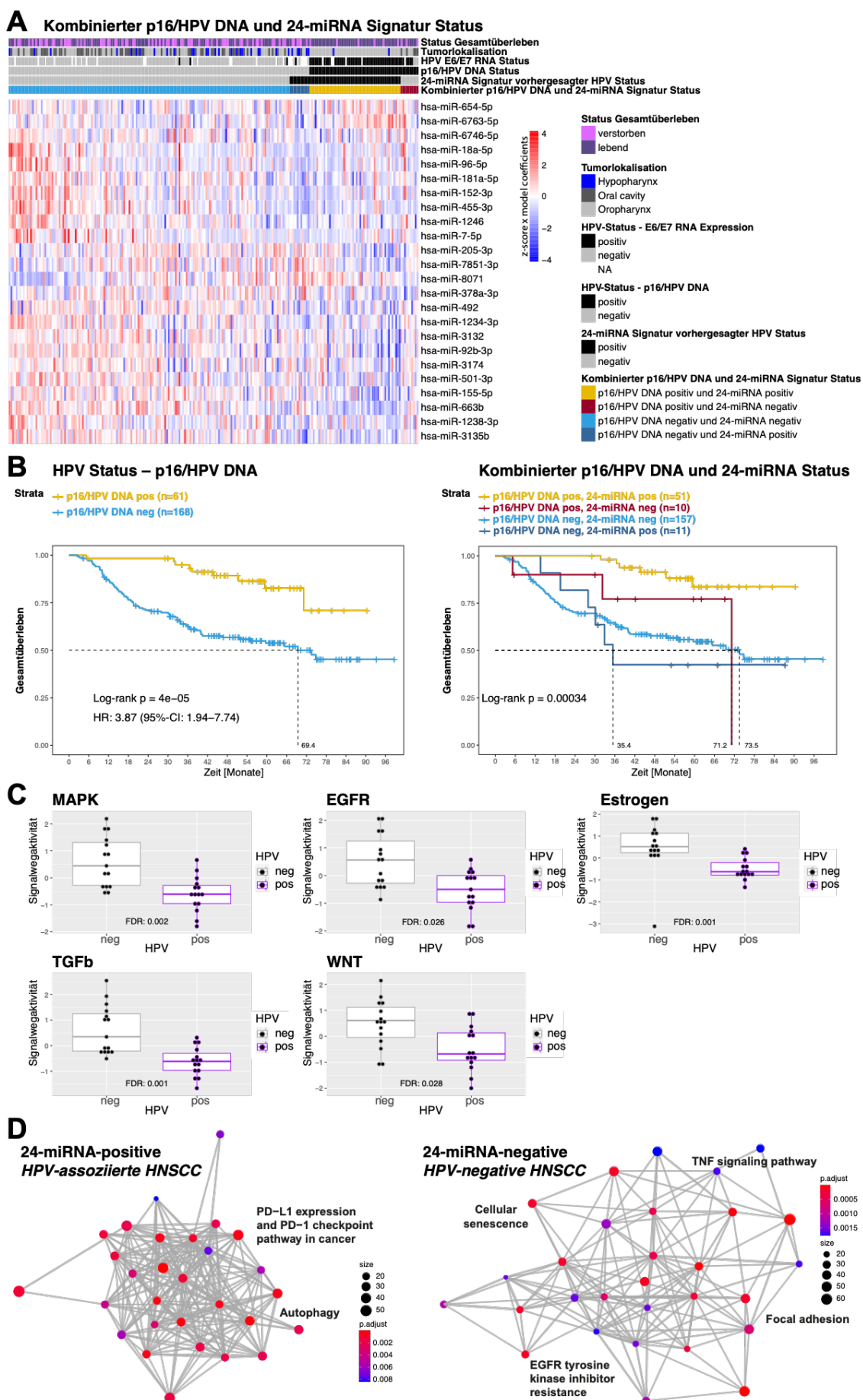


Abbildung 7: Integration von p16/HPV-DNA-Status mit einer 24-miRNA-Signatur

(A) Kombiniertes p16/HPV-DNA- und 24-miRNA-Signatur-Status. Die Heatmap zeigt die skalierten log₂-Expressionswerte der miRNAs, multipliziert mit den Modellkoeffizienten, von niedrig (blau) bis hoch (rot) auf einer Skala von -4 bis 4 für jede der 24 Signatur-miRNAs. Informationen zu Gesamtüberlebensstatus, Tumorlokalisation, E6/E7-RNA-Expression, HPV-Status, p16/HPV-DNA-Status (ground truth), 24-miRNA-Signatur vorhergesagten HPV-Status und kombinierten p16/HPV-DNA- und 24-miRNA-Signatur-Status sind fallweise angegeben. **(B)** Kaplan-Meier-Kurven für den Endpunkt Gesamtüberleben nach p16/HPV-DNA-Status (links) und kombiniertem p16/HPV-DNA- und 24-miRNA-Signatur-Status (rechts). p-Werte wurden mit dem Log-Rank-Test ermittelt. Angegeben sind die Hazard Ratios (HR) mit 95 %-Konfidenzintervallen (CI) und die mediane Gesamtüberlebenszeit. **(C)** Differenziell exprimierte Gene und Aktivität der Signalwege in 24-miRNA-Signatur-vorhersagenden HPV-positiven gegenüber HPV-negativen HNSCC. Boxplots veranschaulichen die Aktivität der Signalwege, die durch eine Progeny-Analyse der differenziell exprimierten Gene (n = 658) in 24-miRNA-positiven/HPV-positiven (n = 15) und 24-miRNA-negativen/HPV-negativen (n = 15) HNSCC abgeleitet wurden. Dargestellt sind die Interquartilbereiche mit Mittelwertlinien. Es sind FDR-adjustierten p-Werte angegeben. **(D)** Pathway enrichment Analyse der 24-Signatur-miRNA-mRNA-Interaktionen: Enrichment Maps mit signifikant angereicherten KEGG-Signalwegen (adjustierte p-Werte < 0,05) der Top 1000 miRNA-mRNA-Interaktionen. Die Anzahl der in einem KEGG-Signalweg angereicherten Gene ist angegeben. Signalwege, die ausschließlich in 24-miRNA-positiven/HPV-assoziierten (links) oder 24-miRNA-negativen/HPV-negativen Tumoren (rechts) vorkommen, sind benannt. Abbildung modifiziert nach [37].

Die prognostischen Werte von 24-miRNA-Signatur, p16/HPV-DNA-Status und p16-Status waren für die analysierten Endpunkte Gesamtüberleben, lokoregionäre Kontrolle und Rezidivfreiheit vergleichbar. Die Kombination von p16/HPV-DNA- und 24-miRNA-Signaturstatus identifizierte eine HPV-assoziierte Subgruppe mit schlechterem Gesamtüberleben (p = 0,00034; Abbildung 7B).

Um biologisch regulatorische Funktionen der Signatur-miRNAs abzuleiten, wurden RNA-seq-Daten von den LMU-KKG-Tumoren mit den 15 höchsten und 15 niedrigsten HPV-Vorhersagewerten mit der miRNA-Signatur integriert. Eine differenzielle Genexpressionsanalyse zwischen 24-miRNA-positiven/HPV-positiven und 24-miRNA-negativen/HPV-negativen HNSCC ergab n = 658 signifikant differenziell exprimierte Gene (FDR < 0,1, |log₂FC| > 0,5). In HPV-positiven Tumoren war die MAPK-, Östrogen-, EGFR-, TGFbeta- und WNT-Signalaktivität im Vergleich zu HPV-negativen Tumoren signifikant verringert (Abbildung 7C). Die Integration der miRNA-Signatur mit Genexpression ergab eine

HPV-spezifische Regulierung des PD-L1-Expression/PD-1-Checkpoint-Signalwegs und der Autophagie. Der TNF-Signalweg sowie die Signalwege der zellulären Seneszenz, fokalen Adhäsion und EGFR-Tyrosinkinase-Inhibitor-Resistenz waren dahingegen ausschließlich bei HPV-negativen Tumoren signifikant angereichert (adjustierte $p < 0,05$; Abbildung 7D).

Die Integration des klinisch ermittelten p16/HPV-DNA-Status mit einer HPV-assoziierten 24-miRNA-Signatur verbesserte die klinisch relevante Risikostratifizierung. Die funktionelle Zuordnung der miRNA-Signatur deutet auf eine wichtige posttranskriptionelle integrative Rolle in wichtigen, beim HNSCC deregulierten Signalwegen hin. Somit könnten mittels 24-miRNA-Signatur HPV-positive Patienten identifiziert werden, bei denen aufgrund der schlechteren Prognose eine Therapie-Deeskalation nicht angezeigt ist.

2.8 Zusammenfassung und Ausblick

Die vorliegende kumulative Habilitationsschrift beschreibt Arbeiten zu molekularen Markern und Prädiktionsmustern, die das Therapieansprechen bei der Radio- bzw. Radiochemotherapie des Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinoms vorhersagen und eine Risikostratifizierung der Patienten ermöglichen. Die Validierung dieser Marker und Prädiktionsmuster in unabhängigen retrospektiven und insbesondere prospektiven HNSCC-Patientenkollektiven ist essenziell für die Entwicklung verbesserter, personalisierter Therapieansätze in der Klinik.

3 Literaturverzeichnis

1. Agrawal, N.; Frederick, M.J.; Pickering, C.R.; Bettegowda, C.; Chang, K.; Li, R.J.; Fakhry, C.; Xie, T.X.; Zhang, J.; Wang, J.; Zhang, N.; El-Naggar, A.K.; Jasser, S.A.; Weinstein, J.N.; Trevino, L.; Drummond, J.A.; Muzny, D.M.; Wu, Y.; Wood, L.D.; Hruban, R.H.; Westra, W.H.; Koch, W.M.; Califano, J.A.; Gibbs, R.A.; Sidransky, D.; Vogelstein, B.; Velculescu, V.E.; Papadopoulos, N.; Wheeler, D.A.; Kinzler, K.W.; Myers, J.N. Exome sequencing of head and neck squamous cell carcinoma reveals inactivating mutations in NOTCH1. *Science* **2011**, *333*, 1154-1157, doi:10.1126/science.1206923.
2. Ang, K.K.; Harris, J.; Wheeler, R.; Weber, R.; Rosenthal, D.I.; Nguyen-Tan, P.F.; Westra, W.H.; Chung, C.H.; Jordan, R.C.; Lu, C.; Kim, H.; Axelrod, R.; Silverman, C.C.; Redmond, K.P.; Gillison, M.L. Human papillomavirus and survival of patients with oropharyngeal cancer. *N Engl J Med* **2010**, *363*, 24-35, doi:10.1056/NEJMoa0912217.
3. Ang, K.K.; Zhang, Q.; Rosenthal, D.I.; Nguyen-Tan, P.F.; Sherman, E.J.; Weber, R.S.; Galvin, J.M.; Bonner, J.A.; Harris, J.; El-Naggar, A.K.; Gillison, M.L.; Jordan, R.C.; Konski, A.A.; Thorstad, W.L.; Trotti, A.; Beitler, J.J.; Garden, A.S.; Spanos, W.J.; Yom, S.S.; Axelrod, R.S. Randomized phase III trial of concurrent accelerated radiation plus cisplatin with or without cetuximab for stage III to IV head and neck carcinoma: RTOG 0522. *J Clin Oncol* **2014**, *32*, 2940-2950, doi:10.1200/JCO.2013.53.5633.
4. Argiris, A.; Karamouzis, M.V.; Raben, D.; Ferris, R.L. Head and neck cancer. *Lancet* **2008**, *371*, 1695-1709, doi:10.1016/S0140-6736(08)60728-X.
5. Bagnoli, M.; Canevari, S.; Califano, D.; Losito, S.; Maio, M.D.; Raspagliesi, F.; Carcangiu, M.L.; Toffoli, G.; Cecchin, E.; Sorio, R.; Canzonieri, V.; Russo, D.; Scognamiglio, G.; Chiappetta, G.; Baldassarre, G.; Lorusso, D.; Scambia, G.; Zannoni, G.F.; Savarese, A.; Carosi, M.; Scollo, P.; Breda, E.; Murgia, V.; Perrone, F.; Pignata, S.; De Cecco, L.; Mezzanzanica, D.; Multicentre Italian Trials in Ovarian cancer translational, g. Development and validation of a microRNA-based signature (MiROvaR) to predict early relapse or progression of epithelial ovarian cancer: a cohort study. *Lancet Oncol* **2016**, *17*, 1137-1146, doi:10.1016/S1470-2045(16)30108-5.
6. Balermipas, P.; Rodel, F.; Krause, M.; Linge, A.; Lohaus, F.; Baumann, M.; Tinhofer, I.; Budach, V.; Sak, A.; Stuschke, M.; Gkika, E.; Grosu, A.L.; Abdollahi, A.; Debus, J.; Stangl, S.; Ganswindt, U.; Belka, C.; Pigorsch, S.; Multhoff, G.; Combs, S.E.; Welz, S.; Zips, D.; Lim, S.Y.; Rodel, C.; Fokas, E.; Dktk, R.O.G. The PD-1/PD-L1 axis and human papilloma virus in patients with head and neck cancer after adjuvant chemoradiotherapy: A multicentre study of the German Cancer Consortium Radiation Oncology Group (DKTK-ROG). *Int J Cancer* **2017**, *141*, 594-603, doi:10.1002/ijc.30770.
7. Barker, H.E.; Paget, J.T.; Khan, A.A.; Harrington, K.J. The tumour microenvironment after radiotherapy: mechanisms of resistance and recurrence. *Nat Rev Cancer* **2015**, *15*, 409-425, doi:10.1038/nrc3958.
8. Bauer, V.L.; Braselmann, H.; Henke, M.; Mattern, D.; Walch, A.; Unger, K.; Baudis, M.; Lassmann, S.; Huber, R.; Wienberg, J.; Werner, M.; Zitzelsberger, H.F. Chromosomal changes characterize head and neck cancer with poor prognosis. *J Mol Med (Berl)* **2008**, *86*, 1353-1365, doi:10.1007/s00109-008-0397-0.
9. Baumeister, P.; Hollmann, A.; Kitz, J.; Afthonidou, A.; Simon, F.; Shakhtour, J.; Mack, B.; Kranz, G.; Libl, D.; Leu, M.; Schirmer, M.A.; Canis, M.; Belka, C.; Zitzelsberger, H.; Ganswindt, U.; Hess, J.; Jakob, M.; Unger, K.; Gires, O. High Expression of EpCAM and Sox2 is a Positive Prognosticator of Clinical Outcome for Head and Neck Carcinoma. *Sci Rep* **2018**, *8*, 14582, doi:10.1038/s41598-018-32178-8.
10. Bernier, J.; Cooper, J.S.; Pajak, T.F.; van Glabbeke, M.; Bourhis, J.; Forastiere, A.; Ozsahin, E.M.; Jacobs, J.R.; Jassem, J.; Ang, K.K.; Lefebvre, J.L. 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* **2005**, *27*, 843-850, doi:10.1002/hed.20279.
11. Bernier, J.; Dometge, C.; Ozsahin, M.; Matuszewska, K.; Lefebvre, J.L.; Greiner, R.H.; Giralt, J.; Maingon, P.; Rolland, F.; Bolla, M.; Cognetti, F.; Bourhis, J.; Kirkpatrick, A.; van Glabbeke, M.; European Organization for, R.; Treatment of Cancer, T. Postoperative

- irradiation with or without concomitant chemotherapy for locally advanced head and neck cancer. *N Engl J Med* **2004**, *350*, 1945-1952, doi:10.1056/NEJMoa032641.
12. Blot, W.J.; McLaughlin, J.K.; Winn, D.M.; Austin, D.F.; Greenberg, R.S.; Preston-Martin, S.; Bernstein, L.; Schoenberg, J.B.; Stemhagen, A.; Fraumeni, J.F., Jr. Smoking and drinking in relation to oral and pharyngeal cancer. *Cancer Res* **1988**, *48*, 3282-3287.
 13. Bonner, J.A.; Harari, P.M.; Giralt, J.; Azarnia, N.; Shin, D.M.; Cohen, R.B.; Jones, C.U.; Sur, R.; Raben, D.; Jassem, J.; Ove, R.; Kies, M.S.; Baselga, J.; Youssoufian, H.; Amellal, N.; Rowinsky, E.K.; Ang, K.K. Radiotherapy plus cetuximab for squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med* **2006**, *354*, 567-578, doi:10.1056/NEJMoa053422.
 14. Bonner, J.A.; Harari, P.M.; Giralt, J.; Cohen, R.B.; Jones, C.U.; Sur, R.K.; Raben, D.; Baselga, J.; Spencer, S.A.; Zhu, J.; Youssoufian, H.; Rowinsky, E.K.; Ang, K.K. Radiotherapy plus cetuximab for locoregionally advanced head and neck cancer: 5-year survival data from a phase 3 randomised trial, and relation between cetuximab-induced rash and survival. *Lancet Oncol* **2010**, *11*, 21-28, doi:10.1016/S1470-2045(09)70311-0.
 15. Braselmann, H.; Michna, A.; Hess, J.; Unger, K. CFAssay: statistical analysis of the colony formation assay. *Radiation oncology* **2015**, *10*, 223, doi:10.1186/s13014-015-0529-y.
 16. Buglione, M.; Cavagnini, R.; Di Rosario, F.; Maddalo, M.; Vassalli, L.; Grisanti, S.; Salgarello, S.; Orlandi, E.; Bossi, P.; Majorana, A.; Gastaldi, G.; Berruti, A.; Trippa, F.; Nicolai, P.; Barasch, A.; Russi, E.G.; Raber-Durlacher, J.; Murphy, B.; Magrini, S.M. Oral toxicity management in head and neck cancer patients treated with chemotherapy and radiation: Xerostomia and trismus (Part 2). Literature review and consensus statement. *Crit Rev Oncol Hematol* **2016**, *102*, 47-54, doi:10.1016/j.critrevonc.2016.03.012.
 17. Buglione, M.; Cavagnini, R.; Di Rosario, F.; Sottocornola, L.; Maddalo, M.; Vassalli, L.; Grisanti, S.; Salgarello, S.; Orlandi, E.; Paganelli, C.; Majorana, A.; Gastaldi, G.; Bossi, P.; Berruti, A.; Pavanato, G.; Nicolai, P.; Maroldi, R.; Barasch, A.; Russi, E.G.; Raber-Durlacher, J.; Murphy, B.; Magrini, S.M. Oral toxicity management in head and neck cancer patients treated with chemotherapy and radiation: Dental pathologies and osteoradionecrosis (Part 1) literature review and consensus statement. *Crit Rev Oncol Hematol* **2016**, *97*, 131-142, doi:10.1016/j.critrevonc.2015.08.010.
 18. Burtneess, B.; Bauman, J.E.; Galloway, T. Novel targets in HPV-negative head and neck cancer: overcoming resistance to EGFR inhibition. *Lancet Oncol* **2013**, *14*, e302-309, doi:10.1016/S1470-2045(13)70085-8.
 19. Burtneess, B.; Harrington, K.J.; Greil, R.; Soulieres, D.; Tahara, M.; de Castro, G., Jr.; Psyrris, A.; Baste, N.; Neupane, P.; Bratland, A.; Fuereder, T.; Hughes, B.G.M.; Mesia, R.; Ngamphaiboon, N.; Rordorf, T.; Wan Ishak, W.Z.; Hong, R.L.; Gonzalez Mendoza, R.; Roy, A.; Zhang, Y.; Gumuscu, B.; Cheng, J.D.; Jin, F.; Rischin, D.; Investigators, K.-. Pembrolizumab alone or with chemotherapy versus cetuximab with chemotherapy for recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck (KEYNOTE-048): a randomised, open-label, phase 3 study. *Lancet* **2019**, *394*, 1915-1928, doi:10.1016/S0140-6736(19)32591-7.
 20. Cancer Genome Atlas, N. Comprehensive genomic characterization of head and neck squamous cell carcinomas. *Nature* **2015**, *517*, 576-582, doi:10.1038/nature14129.
 21. Chong, C.R.; Janne, P.A. The quest to overcome resistance to EGFR-targeted therapies in cancer. *Nat Med* **2013**, *19*, 1389-1400, doi:10.1038/nm.3388.
 22. Chung, C.H.; Gillison, M.L. Human papillomavirus in head and neck cancer: its role in pathogenesis and clinical implications. *Clin Cancer Res* **2009**, *15*, 6758-6762, doi:10.1158/1078-0432.CCR-09-0784.
 23. Chung, C.H.; Parker, J.S.; Karaca, G.; Wu, J.; Funkhouser, W.K.; Moore, D.; Butterfoss, D.; Xiang, D.; Zanation, A.; Yin, X.; Shockley, W.W.; Weissler, M.C.; Dressler, L.G.; Shores, C.G.; Yarbrough, W.G.; Perou, C.M. Molecular classification of head and neck squamous cell carcinomas using patterns of gene expression. *Cancer Cell* **2004**, *5*, 489-500.
 24. Cohen, E.E.W.; Soulieres, D.; Le Tourneau, C.; Dinis, J.; Licitra, L.; Ahn, M.J.; Soria, A.; Machiels, J.P.; Mach, N.; Mehra, R.; Burtneess, B.; Zhang, P.; Cheng, J.; Swaby, R.F.; Harrington, K.J.; investigators, K.-. Pembrolizumab versus methotrexate, docetaxel, or cetuximab for recurrent or metastatic head-and-neck squamous cell carcinoma

- (KEYNOTE-040): a randomised, open-label, phase 3 study. *Lancet* **2019**, 393, 156-167, doi:10.1016/S0140-6736(18)31999-8.
25. Cooper, J.S.; Pajak, T.F.; Forastiere, A.A.; Jacobs, J.; Campbell, B.H.; Saxman, S.B.; Kish, J.A.; Kim, H.E.; Cmelak, A.J.; Rotman, M.; Machtay, M.; Ensley, J.F.; Chao, K.S.; Schultz, C.J.; Lee, N.; Fu, K.K.; Radiation Therapy Oncology Group, I. Postoperative concurrent radiotherapy and chemotherapy for high-risk squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med* **2004**, 350, 1937-1944, doi:10.1056/NEJMoa032646.
26. Cooper, J.S.; Zhang, Q.; Pajak, T.F.; Forastiere, A.A.; Jacobs, J.; Saxman, S.B.; Kish, J.A.; Kim, H.E.; Cmelak, A.J.; Rotman, M.; Lustig, R.; Ensley, J.F.; Thorstad, W.; Schultz, C.J.; Yom, S.S.; Ang, K.K. Long-term follow-up of the RTOG 9501/intergroup phase III trial: postoperative concurrent radiation therapy and chemotherapy in high-risk squamous cell carcinoma of the head and neck. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **2012**, 84, 1198-1205, doi:10.1016/j.ijrobp.2012.05.008.
27. Dienstmann, R.; De Dosso, S.; Felip, E.; Tabernero, J. Drug development to overcome resistance to EGFR inhibitors in lung and colorectal cancer. *Mol Oncol* **2012**, 6, 15-26, doi:10.1016/j.molonc.2011.11.009.
28. Eustace, A.; Mani, N.; Span, P.N.; Irlam, J.J.; Taylor, J.; Betts, G.N.; Denley, H.; Miller, C.J.; Homer, J.J.; Rojas, A.M.; Hoskin, P.J.; Buffa, F.M.; Harris, A.L.; Kaanders, J.H.; West, C.M. A 26-gene hypoxia signature predicts benefit from hypoxia-modifying therapy in laryngeal cancer but not bladder cancer. *Clin Cancer Res* **2013**, 19, 4879-4888, doi:10.1158/1078-0432.CCR-13-0542.
29. Ferris, R.L.; Blumenschein, G., Jr.; Fayette, J.; Guigay, J.; Colevas, A.D.; Licitra, L.; Harrington, K.; Kasper, S.; Vokes, E.E.; Even, C.; Worden, F.; Saba, N.F.; Iglesias Docampo, L.C.; Haddad, R.; Rordorf, T.; Kiyota, N.; Tahara, M.; Monga, M.; Lynch, M.; Geese, W.J.; Kopit, J.; Shaw, J.W.; Gillison, M.L. Nivolumab for Recurrent Squamous-Cell Carcinoma of the Head and Neck. *N Engl J Med* **2016**, 375, 1856-1867, doi:10.1056/NEJMoa1602252.
30. Ferris, R.L.; Blumenschein, G., Jr.; Fayette, J.; Guigay, J.; Colevas, A.D.; Licitra, L.; Harrington, K.J.; Kasper, S.; Vokes, E.E.; Even, C.; Worden, F.; Saba, N.F.; Docampo, L.C.I.; Haddad, R.; Rordorf, T.; Kiyota, N.; Tahara, M.; Lynch, M.; Jayaprakash, V.; Li, L.; Gillison, M.L. Nivolumab vs investigator's choice in recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck: 2-year long-term survival update of CheckMate 141 with analyses by tumor PD-L1 expression. *Oral Oncol* **2018**, 81, 45-51, doi:10.1016/j.oraloncology.2018.04.008.
31. Fietkau, R.; Lautenschläger, C.; Sauer, R.; Dunst, J.; Becker, A.; Baumann, M.; Wendt, T.; Gruschow, K.; Hess, C.; Budach, V.; Iro, H. Postoperative concurrent radiochemotherapy versus radiotherapy in high-risk SCCA of the head and neck: Results of the German phase III trial ARO 96-3. *J Clin Oncol* **2006**, 2006 ASCO Annual Meeting Proceedings Part I. Vol 24, No. 18 Supplement, doi:https://doi.org/10.1200/jco.2006.24.18_suppl.5507.
32. Formenti, S.C.; Demaria, S. Combining radiotherapy and cancer immunotherapy: a paradigm shift. *J Natl Cancer Inst* **2013**, 105, 256-265, doi:10.1093/jnci/djs629.
33. Ganci, F.; Sacconi, A.; Manciocco, V.; Sperduti, I.; Battaglia, P.; Covelto, R.; Muti, P.; Strano, S.; Spriano, G.; Fontemaggi, G.; Blandino, G. MicroRNA expression as predictor of local recurrence risk in oral squamous cell carcinoma. *Head Neck* **2016**, 38 Suppl 1, E189-197, doi:10.1002/hed.23969.
34. Gaykalova, D.A.; Mambo, E.; Choudhary, A.; Houghton, J.; Buddavarapu, K.; Sanford, T.; Darden, W.; Adai, A.; Hadd, A.; Latham, G.; Danilova, L.V.; Bishop, J.; Li, R.J.; Westra, W.H.; Hennessey, P.; Koch, W.M.; Ochs, M.F.; Califano, J.A.; Sun, W. Novel insight into mutational landscape of head and neck squamous cell carcinoma. *PLoS One* **2014**, 9, e93102, doi:10.1371/journal.pone.0093102.
35. Gee, H.E.; Camps, C.; Buffa, F.M.; Patiar, S.; Winter, S.C.; Betts, G.; Homer, J.; Corbridge, R.; Cox, G.; West, C.M.; Ragoussis, J.; Harris, A.L. hsa-mir-210 is a marker of tumor hypoxia and a prognostic factor in head and neck cancer. *Cancer* **2010**, 116, 2148-2158, doi:10.1002/ncr.25009.
36. Gross, A.M.; Orosco, R.K.; Shen, J.P.; Egloff, A.M.; Carter, H.; Hofree, M.; Choueiri, M.; Coffey, C.S.; Lippman, S.M.; Hayes, D.N.; Cohen, E.E.; Grandis, J.R.; Nguyen, Q.T.;

- Ideker, T. Multi-tiered genomic analysis of head and neck cancer ties TP53 mutation to 3p loss. *Nat Genet* **2014**, 46, 939-943, doi:10.1038/ng.3051.
37. Hess, J.; Unger, K.; Maihoefer, C.; Schuttrumpf, L.; Weber, P.; Marschner, S.; Wintergerst, L.; Pflugradt, U.; Baumeister, P.; Walch, A.; Woischke, C.; Kirchner, T.; Werner, M.; Sorensen, K.; Baumann, M.; Tinhofer, I.; Combs, S.E.; Debus, J.; Schafer, H.; Krause, M.; Linge, A.; von der Grun, J.; Stuschke, M.; Zips, D.; Canis, M.; Lauber, K.; Ganswindt, U.; Henke, M.; Zitzelsberger, H.; Belka, C. Integration of p16/HPV DNA Status with a 24-miRNA-Defined Molecular Phenotype Improves Clinically Relevant Stratification of Head and Neck Cancer Patients. *Cancers (Basel)* **2022**, 14, doi:10.3390/cancers14153745.
38. Hess, J.; Unger, K.; Maihoefer, C.; Schuttrumpf, L.; Wintergerst, L.; Heider, T.; Weber, P.; Marschner, S.; Braselmann, H.; Samaga, D.; Kuger, S.; Pflugradt, U.; Baumeister, P.; Walch, A.; Woischke, C.; Kirchner, T.; Werner, M.; Werner, K.; Baumann, M.; Budach, V.; Combs, S.E.; Debus, J.; Grosu, A.L.; Krause, M.; Linge, A.; Rodel, C.; Stuschke, M.; Zips, D.; Zitzelsberger, H.F.; Ganswindt, U.; Henke, M.; Belka, C. A Five-MicroRNA Signature Predicts Survival and Disease Control of Patients with Head and Neck Cancer Negative for HPV-infection. *Clin Cancer Res* **2018**, doi:10.1158/1078-0432.CCR-18-0776.
39. Hess, J.; Unger, K.; Orth, M.; Schotz, U.; Schuttrumpf, L.; Zangen, V.; Gimenez-Aznar, I.; Michna, A.; Schneider, L.; Stamp, R.; Selmansberger, M.; Braselmann, H.; Hieber, L.; Drexler, G.A.; Kuger, S.; Klein, D.; Jendrossek, V.; Friedl, A.A.; Belka, C.; Zitzelsberger, H.; Lauber, K. Genomic amplification of Fanconi anemia complementation group A (FancA) in head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC): Cellular mechanisms of radioresistance and clinical relevance. *Cancer Lett* **2017**, 386, 87-99, doi:10.1016/j.canlet.2016.11.014.
40. Hesselink, A.T.; van den Brule, A.J.; Groothuismink, Z.M.; Molano, M.; Berkhof, J.; Meijer, C.J.; Snijders, P.J. Comparison of three different PCR methods for quantifying human papillomavirus type 16 DNA in cervical scrape specimens. *J Clin Microbiol* **2005**, 43, 4868-4871, doi:10.1128/JCM.43.9.4868-4871.2005.
41. Iorio, M.V.; Croce, C.M. MicroRNA dysregulation in cancer: diagnostics, monitoring and therapeutics. A comprehensive review. *EMBO Mol Med* **2012**, 4, 143-159, doi:10.1002/emmm.201100209.
42. Jamali, Z.; Asl Aminabadi, N.; Attaran, R.; Pournagiazar, F.; Ghertasi Oskouei, S.; Ahmadvour, F. MicroRNAs as prognostic molecular signatures in human head and neck squamous cell carcinoma: a systematic review and meta-analysis. *Oral Oncol* **2015**, 51, 321-331, doi:10.1016/j.oraloncology.2015.01.008.
43. Jemal, A.; Bray, F.; Center, M.M.; Ferlay, J.; Ward, E.; Forman, D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* **2011**, 61, 69-90, doi:10.3322/caac.20107.
44. Jemal, A.; Siegel, R.; Ward, E.; Murray, T.; Xu, J.; Thun, M.J. Cancer statistics, 2007. *CA Cancer J Clin* **2007**, 57, 43-66.
45. Kang, J.; Demaria, S.; Formenti, S. Current clinical trials testing the combination of immunotherapy with radiotherapy. *J Immunother Cancer* **2016**, 4, 51, doi:10.1186/s40425-016-0156-7.
46. Keck, M.K.; Zuo, Z.; Khattri, A.; Stricker, T.P.; Brown, C.D.; Imaniguli, M.; Rieke, D.; Endhardt, K.; Fang, P.; Bragelmann, J.; DeBoer, R.; El-Dinali, M.; Aktolga, S.; Lei, Z.; Tan, P.; Rozen, S.G.; Salgia, R.; Weichselbaum, R.R.; Lingen, M.W.; Story, M.D.; Ang, K.K.; Cohen, E.E.; White, K.P.; Vokes, E.E.; Seiwert, T.Y. Integrative analysis of head and neck cancer identifies two biologically distinct HPV and three non-HPV subtypes. *Clin Cancer Res* **2015**, 21, 870-881, doi:10.1158/1078-0432.CCR-14-2481.
47. Koshizuka, K.; Hanazawa, T.; Fukumoto, I.; Kikkawa, N.; Okamoto, Y.; Seki, N. The microRNA signatures: aberrantly expressed microRNAs in head and neck squamous cell carcinoma. *J Hum Genet* **2017**, 62, 3-13, doi:10.1038/jhg.2016.105.
48. Kundu, S.K.; Nestor, M. Targeted therapy in head and neck cancer. *Tumour Biol* **2012**, 33, 707-721, doi:10.1007/s13277-012-0350-2.
49. Leemans, C.R.; Braakhuis, B.J.; Brakenhoff, R.H. The molecular biology of head and neck cancer. *Nat Rev Cancer* **2011**, 11, 9-22, doi:10.1038/nrc2982.

50. Lian, M.; Fang, J.; Han, D.; Ma, H.; Feng, L.; Wang, R.; Yang, F. Microarray gene expression analysis of tumorigenesis and regional lymph node metastasis in laryngeal squamous cell carcinoma. *PLoS One* **2013**, *8*, e84854, doi:10.1371/journal.pone.0084854.
51. Lindh, M.; Gorander, S.; Andersson, E.; Horal, P.; Mattsby-Balzer, I.; Ryd, W. Real-time Taqman PCR targeting 14 human papilloma virus types. *J Clin Virol* **2007**, *40*, 321-324, doi:10.1016/j.jcv.2007.09.009.
52. Lui, V.W.; Hedberg, M.L.; Li, H.; Vangara, B.S.; Pendleton, K.; Zeng, Y.; Lu, Y.; Zhang, Q.; Du, Y.; Gilbert, B.R.; Freilino, M.; Sauerwein, S.; Peyser, N.D.; Xiao, D.; Diergaarde, B.; Wang, L.; Chiosea, S.; Seethala, R.; Johnson, J.T.; Kim, S.; Duvvuri, U.; Ferris, R.L.; Romkes, M.; Nukui, T.; Kwok-Shing Ng, P.; Garraway, L.A.; Hammerman, P.S.; Mills, G.B.; Grandis, J.R. Frequent mutation of the PI3K pathway in head and neck cancer defines predictive biomarkers. *Cancer Discov* **2013**, *3*, 761-769, doi:10.1158/2159-8290.CD-13-0103.
53. Maihoefer, C.; Schuttrumpf, L.; Macht, C.; Pflugradt, U.; Hess, J.; Schneider, L.; Woischke, C.; Walch, A.; Baumeister, P.; Kirchner, T.; Zitzelsberger, H.; Belka, C.; Ganswindt, U. Postoperative (chemo) radiation in patients with squamous cell cancers of the head and neck - clinical results from the cohort of the clinical cooperation group "Personalized Radiotherapy in Head and Neck Cancer". *Radiation oncology* **2018**, *13*, 123, doi:10.1186/s13014-018-1067-1.
54. Maihoefer, C.; Schüttrumpf, L.; Macht, C.; Pflugradt, U.; Hess, J.; Schneider, L.; Woischke, C.; Walch, A.; Baumeister, P.; Kirchner, T.; Zitzelsberger, H.; Belka, C.; Ganswindt, U. Postoperative (chemo) radiation in patients with squamous cell cancers of the head and neck – clinical results from the cohort of the clinical cooperation group “Personalized Radiotherapy in Head and Neck Cancer”. *Radiation Oncology* **2018**, *13*, 123, doi:10.1186/s13014-018-1067-1.
55. Mangoni, M.; Vozenin, M.C.; Biti, G.; Deutsch, E. Normal tissues toxicities triggered by combined anti-angiogenic and radiation therapies: hurdles might be ahead. *Br J Cancer* **2012**, *107*, 308-314, doi:10.1038/bjc.2012.236.
56. Masterson, L.; Sorgeloos, F.; Winder, D.; Lechner, M.; Marker, A.; Malhotra, S.; Sudhoff, H.; Jani, P.; Goon, P.; Sterling, J. Dereglulation of SYCP2 predicts early stage human papillomavirus-positive oropharyngeal carcinoma: A prospective whole transcriptome analysis. *Cancer Sci* **2015**, *106*, 1568-1575, doi:10.1111/cas.12809.
57. Michna, A.; Braselmann, H.; Selmansberger, M.; Dietz, A.; Hess, J.; Gomolka, M.; Hornhardt, S.; Bluthgen, N.; Zitzelsberger, H.; Unger, K. Natural Cubic Spline Regression Modeling Followed by Dynamic Network Reconstruction for the Identification of Radiation-Sensitivity Gene Association Networks from Time-Course Transcriptome Data. *PLoS One* **2016**, *11*, e0160791, doi:10.1371/journal.pone.0160791.
58. Michna, A.; Schotz, U.; Selmansberger, M.; Zitzelsberger, H.; Lauber, K.; Unger, K.; Hess, J. Transcriptomic analyses of the radiation response in head and neck squamous cell carcinoma subclones with different radiation sensitivity: time-course gene expression profiles and gene association networks. *Radiation oncology* **2016**, *11*, 94, doi:10.1186/s13014-016-0672-0.
59. Moeller, B.J.; Yordy, J.S.; Williams, M.D.; Giri, U.; Raju, U.; Molkentine, D.P.; Byers, L.A.; Heymach, J.V.; Story, M.D.; Lee, J.J.; Sturgis, E.M.; Weber, R.S.; Garden, A.S.; Ang, K.K.; Schwartz, D.L. DNA repair biomarker profiling of head and neck cancer: Ku80 expression predicts locoregional failure and death following radiotherapy. *Clin Cancer Res* **2011**, *17*, 2035-2043, doi:10.1158/1078-0432.CCR-10-2641.
60. Ndiaye, C.; Mena, M.; Alemany, L.; Arbyn, M.; Castellsague, X.; Laporte, L.; Bosch, F.X.; de Sanjose, S.; Trottier, H. HPV DNA, E6/E7 mRNA, and p16INK4a detection in head and neck cancers: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Oncol* **2014**, *15*, 1319-1331, doi:10.1016/S1470-2045(14)70471-1.
61. Nelson, N.J. Genetic events in head and neck squamous cell carcinoma revealed. *J Natl Cancer Inst* **2013**, *105*, 1766-1768, doi:10.1093/jnci/djt355.
62. Niyazi, M.; Maihoefer, C.; Krause, M.; Rodel, C.; Budach, W.; Belka, C. Radiotherapy and "new" drugs-new side effects? *Radiat Oncol* **2011**, *6*, 177, doi:10.1186/1748-717X-6-177.

63. O'Sullivan, B.; Huang, S.H.; Siu, L.L.; Waldron, J.; Zhao, H.; Perez-Ordóñez, B.; Weinreb, I.; Kim, J.; Ringash, J.; Bayley, A.; Dawson, L.A.; Hope, A.; Cho, J.; Irish, J.; Gilbert, R.; Gullane, P.; Hui, A.; Liu, F.F.; Chen, E.; Xu, W. Deintensification candidate subgroups in human papillomavirus-related oropharyngeal cancer according to minimal risk of distant metastasis. *J Clin Oncol* **2013**, *31*, 543-550, doi:10.1200/JCO.2012.44.0164.
64. O'Sullivan, B.; Huang, S.H.; Su, J.; Garden, A.S.; Sturgis, E.M.; Dahlstrom, K.; Lee, N.; Riaz, N.; Pei, X.; Koyfman, S.A.; Adelstein, D.; Burkey, B.B.; Friborg, J.; Kristensen, C.A.; Gothelf, A.B.; Hoebbers, F.; Kremer, B.; Speel, E.J.; Bowles, D.W.; Raben, D.; Karam, S.D.; Yu, E.; Xu, W. Development and validation of a staging system for HPV-related oropharyngeal cancer by the International Collaboration on Oropharyngeal cancer Network for Staging (ICON-S): a multicentre cohort study. *Lancet Oncol* **2016**, *17*, 440-451, doi:10.1016/S1470-2045(15)00560-4.
65. Otter, S.; Schick, U.; Gulliford, S.; Lal, P.; Franceschini, D.; Newbold, K.; Nutting, C.; Harrington, K.; Bhide, S. Evaluation of the Risk of Grade 3 Oral and Pharyngeal Dysphagia Using Atlas-Based Method and Multivariate Analyses of Individual Patient Dose Distributions. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **2015**, *93*, 507-515, doi:10.1016/j.ijrobp.2015.07.2263.
66. Peitzsch, C.; Perrin, R.; Hill, R.P.; Dubrovskaya, A.; Kurth, I. Hypoxia as a biomarker for radioresistant cancer stem cells. *Int J Radiat Biol* **2014**, *90*, 636-652, doi:10.3109/09553002.2014.916841.
67. Peng, S.C.; Liao, C.T.; Peng, C.H.; Cheng, A.J.; Chen, S.J.; Huang, C.G.; Hsieh, W.P.; Yen, T.C. MicroRNAs MiR-218, MiR-125b, and Let-7g predict prognosis in patients with oral cavity squamous cell carcinoma. *PLoS One* **2014**, *9*, e102403, doi:10.1371/journal.pone.0102403.
68. Perri, F.; Pacelli, R.; Della Vittoria Scarpato, G.; Cella, L.; Giuliano, M.; Caponigro, F.; Pepe, S. Radioresistance in head and neck squamous cell carcinoma: Biological bases and therapeutic implications. *Head Neck* **2015**, *37*, 763-770, doi:10.1002/hed.23837.
69. Pezzuto, F.; Buonaguro, L.; Caponigro, F.; Ionna, F.; Starita, N.; Annunziata, C.; Buonaguro, F.M.; Tornesello, M.L. Update on Head and Neck Cancer: Current Knowledge on Epidemiology, Risk Factors, Molecular Features and Novel Therapies. *Oncology* **2015**, *89*, 125-136, doi:10.1159/000381717.
70. Piccirillo, J.F.; Vlahiotis, A. Comorbidity in patients with cancer of the head and neck: prevalence and impact on treatment and prognosis. *Curr Oncol Rep* **2006**, *8*, 123-129.
71. Pickering, C.R.; Zhang, J.; Yoo, S.Y.; Bengtsson, L.; Moorthy, S.; Neskey, D.M.; Zhao, M.; Ortega Alves, M.V.; Chang, K.; Drummond, J.; Cortez, E.; Xie, T.X.; Zhang, D.; Chung, W.; Issa, J.P.; Zweidler-McKay, P.A.; Wu, X.; El-Naggar, A.K.; Weinstein, J.N.; Wang, J.; Muzny, D.M.; Gibbs, R.A.; Wheeler, D.A.; Myers, J.N.; Frederick, M.J. Integrative genomic characterization of oral squamous cell carcinoma identifies frequent somatic drivers. *Cancer Discov* **2013**, *3*, 770-781, doi:10.1158/2159-8290.CD-12-0537.
72. Postel-Vinay, S.; Gomez-Roca, C.; Molife, L.R.; Anghun, B.; Levy, A.; Judson, I.; De Bono, J.; Soria, J.C.; Kaye, S.; Paoletti, X. Phase I trials of molecularly targeted agents: should we pay more attention to late toxicities? *J Clin Oncol* **2011**, *29*, 1728-1735, doi:10.1200/JCO.2010.31.9236.
73. Pulte, D.; Brenner, H. Changes in survival in head and neck cancers in the late 20th and early 21st century: a period analysis. *Oncologist* **2010**, *15*, 994-1001, doi:10.1634/theoncologist.2009-0289.
74. Roepman, P.; de Koning, E.; van Leenen, D.; de Weger, R.A.; Kummer, J.A.; Slootweg, P.J.; Holstege, F.C. Dissection of a metastatic gene expression signature into distinct components. *Genome Biol* **2006**, *7*, R117, doi:10.1186/gb-2006-7-12-r117.
75. Schlecht, N.F.; Burk, R.D.; Adrien, L.; Dunne, A.; Kawachi, N.; Sarta, C.; Chen, Q.; Brandwein-Gensler, M.; Prystowsky, M.B.; Childs, G.; Smith, R.V.; Belbin, T.J. Gene expression profiles in HPV-infected head and neck cancer. *J Pathol* **2007**, *213*, 283-293, doi:10.1002/path.2227.
76. Schmidt, S.; Linde, A.; Zwanenburg, A.; Leger, S.; Lohaus, F.; Krenn, C.; Appold, S.; Gudziol, V.; Nowak, A.; von Neubeck, C.; Tinhofer, I.; Budach, V.; Sak, A.; Stuschke, M.; Balersmpas, P.; Rodel, C.; Bunea, H.; Grosu, A.L.; Abdollahi, A.; Debus, J.; Ganswindt, U.; Belka, C.; Pigorsch, S.; Combs, S.E.; Monnich, D.; Zips, D.; Baretton, G.B.; Buchholz, F.;

- Baumann, M.; Krause, M.; Lock, S.; Dtko, R.O.G. Development and Validation of a Gene Signature for Patients with Head and Neck Carcinomas Treated by Postoperative Radio(chemo)therapy. *Clin Cancer Res* **2018**, *24*, 1364-1374, doi:10.1158/1078-0432.CCR-17-2345.
77. Schmitz, S.; Ang, K.K.; Vermorken, J.; Haddad, R.; Suarez, C.; Wolf, G.T.; Hamoir, M.; Machiels, J.P. Targeted therapies for squamous cell carcinoma of the head and neck: current knowledge and future directions. *Cancer Treat Rev* **2014**, *40*, 390-404, doi:10.1016/j.ctrv.2013.09.007.
78. Schoetz, U.; Klein, D.; Hess, J.; Shnayien, S.; Spoerl, S.; Orth, M.; Mutlu, S.; Hennel, R.; Sieber, A.; Ganswindt, U.; Luka, B.; Thomsen, A.R.; Unger, K.; Jendrossek, V.; Zitzelsberger, H.; Bluthgen, N.; Belka, C.; Unkel, S.; Klinger, B.; Lauber, K. Early senescence and production of senescence-associated cytokines are major determinants of radioresistance in head-and-neck squamous cell carcinoma. *Cell Death Dis* **2021**, *12*, 1162, doi:10.1038/s41419-021-04454-5.
79. Schuttrumpf, L.; Marschner, S.; Scheu, K.; Hess, J.; Rietzler, S.; Walch, A.; Baumeister, P.; Kirchner, T.; Ganswindt, U.; Zitzelsberger, H.; Belka, C.; Maihoefer, C. Definitive chemoradiotherapy in patients with squamous cell cancers of the head and neck - results from an unselected cohort of the clinical cooperation group "Personalized Radiotherapy in Head and Neck Cancer". *Radiation oncology* **2020**, *15*, 7, doi:10.1186/s13014-019-1452-4.
80. Seiwert, T.Y.; Zuo, Z.; Keck, M.K.; Khattari, A.; Pedamallu, C.S.; Stricker, T.; Brown, C.; Pugh, T.J.; Stojanov, P.; Cho, J.; Lawrence, M.S.; Getz, G.; Bragelmann, J.; DeBoer, R.; Weichselbaum, R.R.; Langerman, A.; Portugal, L.; Blair, E.; Stenson, K.; Lingen, M.W.; Cohen, E.E.; Vokes, E.E.; White, K.P.; Hammerman, P.S. Integrative and comparative genomic analysis of HPV-positive and HPV-negative head and neck squamous cell carcinomas. *Clin Cancer Res* **2015**, *21*, 632-641, doi:10.1158/1078-0432.CCR-13-3310.
81. Sethi, N.; Wright, A.; Wood, H.; Rabbitts, P. MicroRNAs and head and neck cancer: reviewing the first decade of research. *Eur J Cancer* **2014**, *50*, 2619-2635, doi:10.1016/j.ejca.2014.07.012.
82. Shi, X.; Yi, H.; Ma, S. Measures for the degree of overlap of gene signatures and applications to TCGA. *Brief Bioinform* **2015**, *16*, 735-744, doi:10.1093/bib/bbu049.
83. Siegel, R.L.; Miller, K.D.; Jemal, A. Cancer statistics, 2015. *CA Cancer J Clin* **2015**, *65*, 5-29, doi:10.3322/caac.21254.
84. Simoens, C.; Gheit, T.; Ridder, R.; Gorbashlieva, I.; Holzinger, D.; Lucas, E.; Rehm, S.; Vermeulen, P.; Lammens, M.; Vanderveken, O.M.; Kumar, R.V.; Gangane, N.; Caniglia, A.; Maffini, F.; Rubio, M.B.L.; Anantharaman, D.; Chiocca, S.; Brennan, P.; Pillai, M.R.; Sankaranarayanan, R.; Bogers, J.; Pawlita, M.; Tommasino, M.; Arbyn, M.; group, H.-A.s. Accuracy of high-risk HPV DNA PCR, p16(INK4a) immunohistochemistry or the combination of both to diagnose HPV-driven oropharyngeal cancer. *BMC Infect Dis* **2022**, *22*, 676, doi:10.1186/s12879-022-07654-2.
85. Smeets, S.J.; Braakhuis, B.J.; Abbas, S.; Snijders, P.J.; Ylstra, B.; van de Wiel, M.A.; Meijer, G.A.; Leemans, C.R.; Brakenhoff, R.H. Genome-wide DNA copy number alterations in head and neck squamous cell carcinomas with or without oncogene-expressing human papillomavirus. *Oncogene* **2006**, *25*, 2558-2564, doi:10.1038/sj.onc.1209275.
86. Smeets, S.J.; Hesselink, A.T.; Speel, E.J.; Haesevoets, A.; Snijders, P.J.; Pawlita, M.; Meijer, C.J.; Braakhuis, B.J.; Leemans, C.R.; Brakenhoff, R.H. A novel algorithm for reliable detection of human papillomavirus in paraffin embedded head and neck cancer specimen. *Int J Cancer* **2007**, *121*, 2465-2472, doi:10.1002/ijc.22980.
87. Stransky, N.; Egloff, A.M.; Tward, A.D.; Kostic, A.D.; Cibulskis, K.; Sivachenko, A.; Kryukov, G.V.; Lawrence, M.S.; Sougnez, C.; McKenna, A.; Shefler, E.; Ramos, A.H.; Stojanov, P.; Carter, S.L.; Voet, D.; Cortes, M.L.; Auclair, D.; Berger, M.F.; Saksena, G.; Guiducci, C.; Onofrio, R.C.; Parkin, M.; Romkes, M.; Weissfeld, J.L.; Seethala, R.R.; Wang, L.; Rangel-Escareno, C.; Fernandez-Lopez, J.C.; Hidalgo-Miranda, A.; Melendez-Zajgla, J.; Winckler, W.; Ardlie, K.; Gabriel, S.B.; Meyerson, M.; Lander, E.S.; Getz, G.; Golub, T.R.; Garraway, L.A.; Grandis, J.R. The mutational landscape of head and neck squamous cell carcinoma. *Science* **2011**, *333*, 1157-1160, doi:10.1126/science.1208130.

88. Summerer, I.; Hess, J.; Pitea, A.; Unger, K.; Hieber, L.; Selmansberger, M.; Lauber, K.; Zitzelsberger, H. Integrative analysis of the microRNA-mRNA response to radiochemotherapy in primary head and neck squamous cell carcinoma cells. *BMC genomics* **2015**, *16*, 654, doi:10.1186/s12864-015-1865-x.
89. Tawk, B.; Schwager, C.; Deffaa, O.; Dyckhoff, G.; Warta, R.; Linge, A.; Krause, M.; Weichert, W.; Baumann, M.; Herold-Mende, C.; Debus, J.; Abdollahi, A. Comparative analysis of transcriptomics based hypoxia signatures in head- and neck squamous cell carcinoma. *Radiother Oncol* **2016**, *118*, 350-358, doi:10.1016/j.radonc.2015.11.027.
90. Tinhofer, I.; Budach, V.; Saki, M.; Konschak, R.; Niehr, F.; Johrens, K.; Weichert, W.; Linge, A.; Lohaus, F.; Krause, M.; Neumann, K.; Endris, V.; Sak, A.; Stuschke, M.; Balermipas, P.; Rodel, C.; Avlar, M.; Grosu, A.L.; Abdollahi, A.; Debus, J.; Belka, C.; Pigorsch, S.; Combs, S.E.; Monnich, D.; Zips, D.; Baumann, M.; Dktk, R.O.G. Targeted next-generation sequencing of locally advanced squamous cell carcinomas of the head and neck reveals druggable targets for improving adjuvant chemoradiation. *Eur J Cancer* **2016**, *57*, 78-86, doi:10.1016/j.ejca.2016.01.003.
91. Tonella, L.; Giannoccaro, M.; Alfieri, S.; Canevari, S.; De Cecco, L. Gene Expression Signatures for Head and Neck Cancer Patient Stratification: Are Results Ready for Clinical Application? *Curr Treat Options Oncol* **2017**, *18*, 32, doi:10.1007/s11864-017-0472-2.
92. Toustrup, K.; Sorensen, B.S.; Alsner, J.; Overgaard, J. Hypoxia gene expression signatures as prognostic and predictive markers in head and neck radiotherapy. *Semin Radiat Oncol* **2012**, *22*, 119-127, doi:10.1016/j.semradonc.2011.12.006.
93. Vallath, S.; Sage, E.K.; Kolluri, K.K.; Lourenco, S.N.; Teixeira, V.S.; Chimalapati, S.; George, P.J.; Janes, S.M.; Giangreco, A. CADM1 inhibits squamous cell carcinoma progression by reducing STAT3 activity. *Sci Rep* **2016**, *6*, 24006, doi:10.1038/srep24006.
94. Ventz, S.; Trippa, L.; Schoenfeld, J.D. Lessons Learned from Deescalation Trials in Favorable Risk HPV-Associated Squamous Cell Head and Neck Cancer-A Perspective on Future Trial Designs. *Clin Cancer Res* **2019**, *25*, 7281-7286, doi:10.1158/1078-0432.CCR-19-0945.
95. Vermorken, J.B.; Mesia, R.; Rivera, F.; Remenar, E.; Kawecki, A.; Rottey, S.; Erfan, J.; Zabolotnyy, D.; Kienzer, H.R.; Cupissol, D.; Peyrade, F.; Benasso, M.; Vynnychenko, I.; De Raucourt, D.; Bokemeyer, C.; Schueler, A.; Amellal, N.; Hitt, R. Platinum-based chemotherapy plus cetuximab in head and neck cancer. *N Engl J Med* **2008**, *359*, 1116-1127, doi:10.1056/NEJMoa0802656.
96. Vermorken, J.B.; Specenier, P. Optimal treatment for recurrent/metastatic head and neck cancer. *Ann Oncol* **2010**, *21 Suppl 7*, vii252-261, doi:10.1093/annonc/mdq453.
97. Vissink, A.; Jansma, J.; Spijkervet, F.K.; Burlage, F.R.; Coppes, R.P. Oral sequelae of head and neck radiotherapy. *Crit Rev Oral Biol Med* **2003**, *14*, 199-212.
98. Vokes, E.E.; Agrawal, N.; Seiwert, T.Y. HPV-Associated Head and Neck Cancer. *J Natl Cancer Inst* **2015**, *107*, djv344, doi:10.1093/jnci/djv344.
99. Weber, J.; de la Rosa, J.; Grove, C.S.; Schick, M.; Rad, L.; Baranov, O.; Strong, A.; Pfaus, A.; Friedrich, M.J.; Engleitner, T.; Lersch, R.; Ollinger, R.; Grau, M.; Menendez, I.G.; Martella, M.; Kohlhofer, U.; Banerjee, R.; Turchaninova, M.A.; Scherger, A.; Hoffman, G.J.; Hess, J.; Kuhn, L.B.; Ammon, T.; Kim, J.; Schneider, G.; Unger, K.; Zimmer-Strobl, U.; Heikenwalder, M.; Schmidt-Supprian, M.; Yang, F.; Saur, D.; Liu, P.; Steiger, K.; Chudakov, D.M.; Lenz, G.; Quintanilla-Martinez, L.; Keller, U.; Vassiliou, G.S.; Cadinanos, J.; Bradley, A.; Rad, R. PiggyBac transposon tools for recessive screening identify B-cell lymphoma drivers in mice. *Nat Commun* **2019**, *10*, 1415, doi:10.1038/s41467-019-09180-3.
100. Weber, P.; Kunstner, A.; Hess, J.; Unger, K.; Marschner, S.; Idel, C.; Ribbat-Idel, J.; Baumeister, P.; Gires, O.; Walz, C.; Rietzler, S.; Valeanu, L.; Herkommer, T.; Kreutzer, L.; Klymenko, O.; Drexler, G.; Kirchner, T.; Maihofer, C.; Ganswindt, U.; Walch, A.; Sterr, M.; Lickert, H.; Canis, M.; Rades, D.; Perner, S.; Berriel Diaz, M.; Herzig, S.; Lauber, K.; Wollenberg, B.; Busch, H.; Belka, C.; Zitzelsberger, H. Therapy-Related Transcriptional Subtypes in Matched Primary and Recurrent Head and Neck Cancer. *Clinical cancer*

- research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **2022**, 28, 1038-1052, doi:10.1158/1078-0432.CCR-21-2244.
101. Wintergerst, L.; Selmansberger, M.; Maihoefer, C.; Schuttrumpf, L.; Walch, A.; Wilke, C.; Pitea, A.; Woischke, C.; Baumeister, P.; Kirchner, T.; Belka, C.; Ganswindt, U.; Zitzelsberger, H.; Unger, K.; Hess, J. A prognostic mRNA expression signature of four 16q24.3 genes in radio(chemo)therapy-treated head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC). *Mol Oncol* **2018**, doi:10.1002/1878-0261.12388.
 102. Wong, N.; Khwaja, S.S.; Baker, C.M.; Gay, H.A.; Thorstad, W.L.; Daly, M.D.; Lewis, J.S., Jr.; Wang, X. Prognostic microRNA signatures derived from The Cancer Genome Atlas for head and neck squamous cell carcinomas. *Cancer Med* **2016**, 5, 1619-1628, doi:10.1002/cam4.718.
 103. Wood, O.; Woo, J.; Seumois, G.; Savelyeva, N.; McCann, K.J.; Singh, D.; Jones, T.; Peel, L.; Breen, M.S.; Ward, M.; Garrido Martin, E.; Sanchez-Elsner, T.; Thomas, G.; Vijayanand, P.; Woelk, C.H.; King, E.; Ottensmeier, C. Gene expression analysis of TIL rich HPV-driven head and neck tumors reveals a distinct B-cell signature when compared to HPV independent tumors. *Oncotarget* **2016**, 7, 56781-56797, doi:10.18632/oncotarget.10788.
 104. Ye, H.; Wang, A.; Lee, B.S.; Yu, T.; Sheng, S.; Peng, T.; Hu, S.; Crowe, D.L.; Zhou, X. Proteomic based identification of manganese superoxide dismutase 2 (SOD2) as a metastasis marker for oral squamous cell carcinoma. *Cancer Genomics Proteomics* **2008**, 5, 85-94.

4 Verzeichnis der Originalarbeiten

4.1 Originalarbeiten als Erst- oder Letztautorin

1. Unger, K.*; **Hess, J.***; Link, V.; Buchner, A.; Eze, C.; Li, M.; Stief, C.; Kirchner, T.; Klauschen, F.; Zitzelsberger, H.; Niyazi, M.; Ganswindt, U.; Schmidt-Hege-mann, N.S.; Belka, C. DNA-methylation and genomic copy number in primary tumors and corresponding lymph node metastases in prostate cancer from patients with low and high Gleason score. *Clin Transl Radiat Oncol* **2023**, 39, 100586, doi:10.1016/j.ctro.2023.100586.
2. Lombardo, E.*; **Hess, J.***; Kurz, C.; Riboldi, M.; Marschner, S.; Baumeister, P.; Lauber, K.; Pflugradt, U.; Walch, A.; Canis, M.; Klauschen, F.; Zitzelsberger, H.; Belka, C.; Landry, G.; Unger, K. DeepClassPathway: Molecular pathway aware classification using explainable deep learning. *Eur J Cancer* **2022**, 176, 41-49, doi:10.1016/j.ejca.2022.08.033.
3. Kreutzer, L.; Weber, P.; Heider, T.; Heikenwalder, M.; Riedl, T.; Baumeister, P.; Klauschen, F.; Belka, C.; Walch, A.; Zitzelsberger, H.; **Hess, J.***; Unger, K.* Simultaneous metabolite MALDI-MSI, whole exome and transcriptome analysis from formalin-fixed paraffin-embedded tissue sections. *Lab Invest* **2022**, 102, 1400-1405, doi:10.1038/s41374-022-00829-0.
4. **Hess, J.**; Unger, K.; Maihoefer, C.; Schüttrumpf, L.; Weber, P.; Marschner, S.; Wintergerst, L.; Pflugradt, U.; Baumeister, P.; Walch, A.; Woischke, C.; Kirchner, T.; Werner, M.; Sorensen, K.; Baumann, M.; Tinhofer, I.; Combs, S.E.; Debus, J.; Schafer, H.; Krause, M.; Linge, A.; von der Grun, J.; Stuschke, M.; Zips, D.; Canis, M.; Lauber, K.; Ganswindt, U.; Henke, M.; Zitzelsberger, H.; Belka, C. Integration of p16/HPV DNA Status with a 24-miRNA-Defined Molecular Phenotype Improves Clinically Relevant Stratification of Head and Neck Cancer Patients. *Cancers (Basel)* **2022**, 14, doi:10.3390/cancers14153745.
5. Weber, P.*; Kunstner, A.*; **Hess, J.***; Unger, K.*; Marschner, S.; Idel, C.; Ribbat-Idel, J.; Baumeister, P.; Gires, O.; Walz, C.; Rietzler, S.; Valeanu, L.; Herkommer, T.; Kreutzer, L.; Klymenko, O.; Drexler, G.; Kirchner, T.; Maihofer, C.; Ganswindt, U.; Walch, A.; Sterr, M.; Lickert, H.; Canis, M.; Rades, D.; Perner, S.; Berriel Diaz, M.; Herzig, S.; Lauber, K.; Wollenberg, B.; Busch, H.; Belka, C.; Zitzelsberger, H. Therapy-Related Transcriptional Subtypes in Matched Primary and Recurrent Head and Neck Cancer. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research* **2022**, 28, 1038-1052, doi:10.1158/1078-0432.CCR-21-2244.
6. **Hess, J.**; Unger, K.; Maihoefer, C.; Schüttrumpf, L.; Wintergerst, L.; Heider, T.; Weber, P.; Marschner, S.; Braselmann, H.; Samaga, D.; Kuger, S.; Pflugradt, U.; Baumeister, P.; Walch, A.; Woischke, C.; Kirchner, T.; Werner, M.; Werner, K.; Baumann, M.; Budach, V.; Combs, S.E.; Debus, J.; Grosu, A.L.; Krause, M.; Linge, A.; Rodel, C.; Stuschke, M.; Zips, D.; Zitzelsberger, H.; Ganswindt, U.; Henke, M.; Belka, C. A Five-MicroRNA Signature Predicts Survival and Disease

- Control of Patients with Head and Neck Cancer Negative for HPV Infection. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research* **2019**, 25, 1505-1516, doi:10.1158/1078-0432.CCR-18-0776.
7. Wintergerst, L.; Selmansberger, M.; Maihoefer, C.; Schüttrumpf, L.; Walch, A.; Wilke, C.; Pitea, A.; Woischke, C.; Baumeister, P.; Kirchner, T.; Belka, C.; Ganswindt, U.; Zitzelsberger, H.; Unger, K.; **Hess, J.** A prognostic mRNA expression signature of four 16q24.3 genes in radio(chemo)therapy-treated head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC). *Mol Oncol* **2018**, 12, 2085-2101, doi:10.1002/1878-0261.12388.
 8. **Hess, J.**; Unger, K.; Orth, M.; Schotz, U.; Schüttrumpf, L.; Zangen, V.; Gimenez-Aznar, I.; Michna, A.; Schneider, L.; Stamp, R.; Selmansberger, M.; Braselmann, H.; Hieber, L.; Drexler, G.A.; Kuger, S.; Klein, D.; Jendrossek, V.; Friedl, A.A.; Belka, C.; Zitzelsberger, H.; Lauber, K. Genomic amplification of Fanconi anemia complementation group A (FancA) in head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC): Cellular mechanisms of radioresistance and clinical relevance. *Cancer Lett* **2017**, 386, 87-99, doi:10.1016/j.canlet.2016.11.014.
 9. Michna, A.; Schotz, U.; Selmansberger, M.; Zitzelsberger, H.; Lauber, K.; Unger, K.; **Hess, J.** Transcriptomic analyses of the radiation response in head and neck squamous cell carcinoma subclones with different radiation sensitivity: time-course gene expression profiles and gene association networks. *Radiation oncology* **2016**, 11, 94, doi:10.1186/s13014-016-0672-0.
 10. Selmansberger, M.; Feuchtinger, A.; Zurnadzhy, L.; Michna, A.; Kaiser, J.C.; Abend, M.; Brenner, A.; Bogdanova, T.; Walch, A.; Unger, K.; Zitzelsberger, H.; **Hess, J.** CLIP2 as radiation biomarker in papillary thyroid carcinoma. *Oncogene* **2015**, 34, 3917-3925, doi:10.1038/onc.2014.311.
 11. Heiliger, K.J.*; **Hess, J.***; Vitagliano, D.; Salerno, P.; Braselmann, H.; Salvatore, G.; Ugolini, C.; Summerer, I.; Bogdanova, T.; Unger, K.; Thomas, G.; Santoro, M.; Zitzelsberger, H. Novel candidate genes of thyroid tumorigenesis identified in Trk-T1 transgenic mice. *Endocrine-related cancer* **2012**, 19, 409-421, doi:10.1530/ERC-11-0387.
 12. **Hess, J.**; Thomas, G.; Braselmann, H.; Bauer, V.; Bogdanova, T.; Wienberg, J.; Zitzelsberger, H.; Unger, K. Gain of chromosome band 7q11 in papillary thyroid carcinomas of young patients is associated with exposure to low-dose irradiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2011**, 108, 9595-9600, doi:10.1073/pnas.1017137108.

***geteilte Erst-/ oder Letztautorenschaft**

4.2 Originalarbeiten als Koautorin

1. Marschner, S.N.; Maihofer, C.; Spath, R.; Haehl, E.; Reitz, D.; Kienlechner, N.; Schuttrumpf, L.; Baumeister, P.; Pflugradt, U.; **Hess, J.**; Zitzelsberger, H.; Unger, K.; Belka, C.; Walter, F. Adjuvant (chemo)radiotherapy for patients with head and neck cancer: can comorbidity risk scores predict outcome? *Strahlenther Onkol* **2024**, doi:10.1007/s00066-024-02282-y.
2. Danko, B.; **Hess, J.**; Unger, K.; Samaga, D.; Walz, C.; Walch, A.; Sun, N.; Baumeister, P.; Zeng, P.Y.F.; Walter, F.; Marschner, S.; Spath, R.; Gires, O.; Herkommer, T.; Dazeh, R.; Matos, T.; Kreutzer, L.; Matschke, J.; Eul, K.; Klauschen, F.; Pflugradt, U.; Canis, M.; Ganswindt, U.; Mymryk, J.S.; Wollenberg, B.; Nichols, A.C.; Belka, C.; Zitzelsberger, H.; Lauber, K.; Selmsberger, M. Metabolic pathway-based subtypes associate glycan biosynthesis and treatment response in head and neck cancer. *NPJ Precis Oncol* **2024**, *8*, 116, doi:10.1038/s41698-024-00602-0.
3. Schnoller, L.E.; Piehlmaier, D.; Weber, P.; Brix, N.; Fleischmann, D.F.; Nieto, A.E.; Selmsberger, M.; Heider, T.; **Hess, J.**; Niyazi, M.; Belka, C.; Lauber, K.; Unger, K.; Orth, M. Systematic in vitro analysis of therapy resistance in glioblastoma cell lines by integration of clonogenic survival data with multi-level molecular data. *Radiation oncology* **2023**, *18*, 51, doi:10.1186/s13014-023-02241-4.
4. Burkart, S.; Weusthof, C.; Khorani, K.; Steen, S.; Stogbauer, F.; Unger, K.; **Hess, J.**; Zitzelsberger, H.; Belka, C.; Kurth, I.; Hess, J. A Novel Subgroup of UCHL1-Related Cancers Is Associated with Genomic Instability and Sensitivity to DNA-Damaging Treatment. *Cancers (Basel)* **2023**, *15*, doi:10.3390/cancers15061655.
5. Budeus, B.; Unger, K.; **Hess, J.**; Sentek, H.; Klein, D. Comparative computational analysis to distinguish mesenchymal stem cells from fibroblasts. *Front Immunol* **2023**, *14*, 1270493, doi:10.3389/fimmu.2023.1270493.
6. Weiss, B.G.; Anczykowski, M.Z.; Ihler, F.; Bertlich, M.; Spiegel, J.L.; Haubner, F.; Canis, M.; Kuffer, S.; **Hess, J.**; Unger, K.; Kitz, J.; Jakob, M. MicroRNA-182-5p and microRNA-205-5p as potential biomarkers for prognostic stratification of p16-positive oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Cancer Biomark* **2022**, *33*, 331-347, doi:10.3233/CBM-203149.
7. Tiwari, D.K.; Hannen, R.; Unger, K.; Kohl, S.; **Hess, J.**; Lauber, K.; Subtil, F.S.B.; Dikomey, E.; Engenhart-Cabillic, R.; Schotz, U. IL1 Pathway in HPV-Negative HNSCC Cells Is an Indicator of Radioresistance After Photon and Carbon Ion Irradiation Without Functional Involvement. *Front Oncol* **2022**, *12*, 878675, doi:10.3389/fonc.2022.878675.
8. Thomsen, A.R.; Aldrian, C.; Luka, B.; Hornhardt, S.; Gomolka, M.; Moertl, S.; **Hess, J.**; Zitzelsberger, H.; Heider, T.; Schlueter, N.; Rau, S.; Monroy Ordonez, B.; Schafer, H.; Rucker, G.; Henke, M. Biopsy-derived oral keratinocytes - A

- model to potentially test for oral mucosa radiation sensitivity. *Clin Transl Radiat Oncol* **2022**, 34, 51-56, doi:10.1016/j.ctro.2022.03.007.
9. Tawk, B.; Wirkner, U.; Schwager, C.; Rein, K.; Zaoui, K.; Federspil, P.A.; Adeberg, S.; Linge, A.; Ganswindt, U.; **Hess, J.**; Unger, K.; Tinhofer, I.; Budach, V.; Lohaus, F.; Krause, M.; Guberina, M.; Stuschke, M.; Balermipas, P.; Rodel, C.; Grosu, A.L.; Schafer, H.; Zips, D.; Combs, S.E.; Pigorsch, S.; Zitzelsberger, H.; Baumeister, P.; Kirchner, T.; Bewerunge-Hudler, M.; Weichert, W.; Hess, J.; Herpel, E.; Belka, C.; Baumann, M.; Debus, J.; Abdollahi, A.; Dtk, R.O.G. Tumor DNA-methylome derived epigenetic fingerprint identifies HPV-negative head and neck patients at risk for locoregional recurrence after postoperative radiochemotherapy. *Int J Cancer* **2022**, 150, 603-616, doi:10.1002/ijc.33842.
 10. Schnoller, L.E.; Albrecht, V.; Brix, N.; Nieto, A.E.; Fleischmann, D.F.; Niyazi, M.; **Hess, J.**; Belka, C.; Unger, K.; Lauber, K.; Orth, M. Integrative analysis of therapy resistance and transcriptomic profiling data in glioblastoma cells identifies sensitization vulnerabilities for combined modality radiochemotherapy. *Radiation oncology* **2022**, 17, 79, doi:10.1186/s13014-022-02052-z.
 11. Schinke, H.; Shi, E.; Lin, Z.; Quadt, T.; Kranz, G.; Zhou, J.; Wang, H.; **Hess, J.**; Heuer, S.; Belka, C.; Zitzelsberger, H.; Schumacher, U.; Genduso, S.; Riecken, K.; Gao, Y.; Wu, Z.; Reichel, C.A.; Walz, C.; Canis, M.; Unger, K.; Baumeister, P.; Pan, M.; Gires, O. A transcriptomic map of EGFR-induced epithelial-to-mesenchymal transition identifies prognostic and therapeutic targets for head and neck cancer. *Mol Cancer* **2022**, 21, 178, doi:10.1186/s12943-022-01646-1.
 12. Flach, S.; Kumbrink, J.; Walz, C.; **Hess, J.**; Drexler, G.; Belka, C.; Canis, M.; Jung, A.; Baumeister, P. Analysis of genetic variants of frequently mutated genes in HPV-negative primary head and neck squamous cell carcinoma, resection margins, local recurrences and corresponding circulating cell-free DNA. *J Oral Pathol Med* **2022**, doi:10.1111/jop.13338.
 13. Stadler, D.; Kachele, M.; Jones, A.N.; **Hess, J.**; Urban, C.; Schneider, J.; Xia, Y.; Oswald, A.; Nebioglu, F.; Bester, R.; Lasitschka, F.; Ringelhan, M.; Ko, C.; Chou, W.M.; Geerlof, A.; van de Klundert, M.A.; Wettengel, J.M.; Schirmacher, P.; Heikenwalder, M.; Schreiner, S.; Bartenschlager, R.; Pichlmair, A.; Sattler, M.; Unger, K.; Protzer, U. Interferon-induced degradation of the persistent hepatitis B virus cccDNA form depends on ISG20. *EMBO Rep* **2021**, 22, e49568, doi:10.15252/embr.201949568.
 14. Schoetz, U.; Klein, D.; **Hess, J.**; Shnayien, S.; Spoerl, S.; Orth, M.; Mutlu, S.; Hennel, R.; Sieber, A.; Ganswindt, U.; Luka, B.; Thomsen, A.R.; Unger, K.; Jendrossek, V.; Zitzelsberger, H.; Bluthgen, N.; Belka, C.; Unkel, S.; Klinger, B.; Lauber, K. Early senescence and production of senescence-associated cytokines are major determinants of radioresistance in head-and-neck squamous cell carcinoma. *Cell Death Dis* **2021**, 12, 1162, doi:10.1038/s41419-021-04454-5.

15. Schinke, H.; Heider, T.; Herkommer, T.; Simon, F.; Blancke Soares, A.; Kranz, G.; Samaga, D.; Dajka, L.; Feuchtinger, A.; Walch, A.; Valeanu, L.; Walz, C.; Kirchner, T.; Canis, M.; Baumeister, P.; Belka, C.; Maihofer, C.; Marschner, S.; Pflugradt, U.; Ganswindt, U.; **Hess, J.**; Zitzelsberger, H.; Gires, O. Digital scoring of EpCAM and slug expression as prognostic markers in head and neck squamous cell carcinomas. *Mol Oncol* **2021**, *15*, 1040-1053, doi:10.1002/1878-0261.12886.
16. Orth, M.; Albrecht, V.; Seidl, K.; Kinzel, L.; Unger, K.; **Hess, J.**; Kreutzer, L.; Sun, N.; Stegen, B.; Nieto, A.; Maas, J.; Winssinger, N.; Friedl, A.A.; Walch, A.K.; Belka, C.; Zitzelsberger, H.; Niyazi, M.; Lauber, K. Inhibition of HSP90 as a Strategy to Radiosensitize Glioblastoma: Targeting the DNA Damage Response and Beyond. *Front Oncol* **2021**, *11*, 612354, doi:10.3389/fonc.2021.612354.
17. Ogundipe, V.M.L.; Groen, A.H.; Hosper, N.; Nagle, P.W.K.; **Hess, J.**; Faber, H.; Jellema, A.L.; Baanstra, M.; Links, T.P.; Unger, K.; Plukker, J.T.M.; Coppes, R.P. Generation and Differentiation of Adult Tissue-Derived Human Thyroid Organoids. *Stem Cell Reports* **2021**, *16*, 913-925, doi:10.1016/j.stemcr.2021.02.011.
18. Krug, D.; Hecht, M.; Ebert, N.; Maurer, M.; Fleischmann, D.F.; Fokas, E.; Straube, C.; Nicolay, N.H.; Horner-Rieber, J.; Schmitt, D.; von Neubeck, C.; Zamboglou, C.; Sperk, E.; Kaul, D.; **Hess, J.**; Corradini, S.; Seidel, C.; Gani, C.; Baues, C.; Frey, B.; Blanck, O.; Gauer, T.; Niyazi, M. Innovative radiation oncology Together - Precise, Personalized, Human : Vision 2030 for radiotherapy & radiation oncology in Germany. *Strahlenther Onkol* **2021**, *197*, 1043-1048, doi:10.1007/s00066-021-01843-9.
19. Jakob, M.; Mattes, L.M.; Unger, K.; Kueffer, S.; **Hess, J.**; Canis, M.; Schirmer, M.; Spiegel, J.L.; Haubner, F.; Ihler, F.; Weiss, B.G.; Kitz, J. Human microRNA-182-5p and kinectin 1: Potential biomarkers for prognosis in oral squamous cell carcinoma. *Head Neck* **2021**, *43*, 3707-3719, doi:10.1002/hed.26857.
20. Hirschberger, S.; Strauss, G.; Effinger, D.; Marstaller, X.; Ferstl, A.; Muller, M.B.; Wu, T.; Hubner, M.; Rahmel, T.; Mascolo, H.; Exner, N.; **Hess, J.**; Kreth, F.W.; Unger, K.; Kreth, S. Very-low-carbohydrate diet enhances human T-cell immunity through immunometabolic reprogramming. *EMBO Mol Med* **2021**, *13*, e14323, doi:10.15252/emmm.202114323.
21. Hansel, C.; Barr, S.; Schemann, A.V.; Lauber, K.; **Hess, J.**; Unger, K.; Zitzelsberger, H.; Jendrossek, V.; Klein, D. Metformin Protects against Radiation-Induced Acute Effects by Limiting Senescence of Bronchial-Epithelial Cells. *Int J Mol Sci* **2021**, *22*, doi:10.3390/ijms22137064.
22. Unger, K.; Fleischmann, D.F.; Ruf, V.; Felsberg, J.; Piehlmaier, D.; Samaga, D.; **Hess, J.**; Suresh, M.P.; Mittelbronn, M.; Lauber, K.; Budach, W.; Sabel, M.; Rodel, C.; Reifenberger, G.; Herms, J.; Tonn, J.C.; Zitzelsberger, H.; Belka, C.; Niyazi, M. Improved risk stratification in younger IDH wild-type glioblastoma

- patients by combining a 4-miRNA signature with MGMT promoter methylation status. *Neurooncol Adv* **2020**, 2, vdaa137, doi:10.1093/noajnl/vdaa137.
23. Steens, J.; Unger, K.; Klar, L.; Neureiter, A.; Wieber, K.; **Hess, J.**; Jakob, H.G.; Klump, H.; Klein, D. Direct conversion of human fibroblasts into therapeutically active vascular wall-typical mesenchymal stem cells. *Cell Mol Life Sci* **2020**, 77, 3401-3422, doi:10.1007/s00018-019-03358-0.
 24. Selmansberger, M.; Michna, A.; Braselmann, H.; Hofig, I.; Schorpp, K.; Weber, P.; Anastasov, N.; Zitzelsberger, H.; **Hess, J.**; Unger, K. Transcriptome network of the papillary thyroid carcinoma radiation marker CLIP2. *Radiation oncology* **2020**, 15, 182, doi:10.1186/s13014-020-01620-5.
 25. Schüttrumpf, L.; Marschner, S.; Scheu, K.; **Hess, J.**; Rietzler, S.; Walch, A.; Baumeister, P.; Kirchner, T.; Ganswindt, U.; Zitzelsberger, H.; Belka, C.; Maihoefer, C. Definitive chemoradiotherapy in patients with squamous cell cancers of the head and neck - results from an unselected cohort of the clinical cooperation group "Personalized Radiotherapy in Head and Neck Cancer". *Radiation oncology* **2020**, 15, 7, doi:10.1186/s13014-019-1452-4.
 26. Samaga, D.; Hornung, R.; Braselmann, H.; **Hess, J.**; Zitzelsberger, H.; Belka, C.; Boulesteix, A.L.; Unger, K. Single-center versus multi-center data sets for molecular prognostic modeling: a simulation study. *Radiation oncology* **2020**, 15, 109, doi:10.1186/s13014-020-01543-1.
 27. Weber, J.; de la Rosa, J.; Grove, C.S.; Schick, M.; Rad, L.; Baranov, O.; Strong, A.; Pfaus, A.; Friedrich, M.J.; Engleitner, T.; Lersch, R.; Ollinger, R.; Grau, M.; Menendez, I.G.; Martella, M.; Kohlhofer, U.; Banerjee, R.; Turchaninova, M.A.; Scherger, A.; Hoffman, G.J.; **Hess, J.**; Kuhn, L.B.; Ammon, T.; Kim, J.; Schneider, G.; Unger, K.; Zimmer-Strobl, U.; Heikenwalder, M.; Schmidt-Suppran, M.; Yang, F.; Saur, D.; Liu, P.; Steiger, K.; Chudakov, D.M.; Lenz, G.; Quintanilla-Martinez, L.; Keller, U.; Vassiliou, G.S.; Cadinanos, J.; Bradley, A.; Rad, R. PiggyBac transposon tools for recessive screening identify B-cell lymphoma drivers in mice. *Nat Commun* **2019**, 10, 1415, doi:10.1038/s41467-019-09180-3.
 28. Jakob, M.; Mattes, L.M.; Kuffer, S.; Unger, K.; **Hess, J.**; Bertlich, M.; Haubner, F.; Ihler, F.; Canis, M.; Weiss, B.G.; Kitz, J. MicroRNA expression patterns in oral squamous cell carcinoma: hsa-mir-99b-3p and hsa-mir-100-5p as novel prognostic markers for oral cancer. *Head Neck* **2019**, 41, 3499-3515, doi:10.1002/hed.25866.
 29. Wilke, C.M.; **Hess, J.**; Klymenko, S.V.; Chumak, V.V.; Zakhartseva, L.M.; Bakhanova, E.V.; Feuchtinger, A.; Walch, A.K.; Selmansberger, M.; Braselmann, H.; Schneider, L.; Pitea, A.; Steinhilber, J.; Fend, F.; Bosmuller, H.C.; Zitzelsberger, H.; Unger, K. Expression of miRNA-26b-5p and its target TRPS1 is associated with radiation exposure in post-Chernobyl breast cancer. *Int J Cancer* **2018**, 142, 573-583, doi:10.1002/ijc.31072.
 30. Wilke, C.M.; Braselmann, H.; **Hess, J.**; Klymenko, S.V.; Chumak, V.V.; Zakhartseva, L.M.; Bakhanova, E.V.; Walch, A.K.; Selmansberger, M.; Samaga,

- D.; Weber, P.; Schneider, L.; Fend, F.; Bosmuller, H.C.; Zitzelsberger, H.; Unger, K. A genomic copy number signature predicts radiation exposure in post-Chernobyl breast cancer. *Int J Cancer* **2018**, *143*, 1505-1515, doi:10.1002/ijc.31533.
31. Pan, M.; Schinke, H.; Luxenburger, E.; Kranz, G.; Shakhtour, J.; Libl, D.; Huang, Y.; Gaber, A.; Pavsic, M.; Lenarcic, B.; Kitz, J.; Jakob, M.; Schwenk-Zieger, S.; Canis, M.; **Hess, J.**; Unger, K.; Baumeister, P.; Gires, O. EpCAM ectodomain EpEX is a ligand of EGFR that counteracts EGF-mediated epithelial-mesenchymal transition through modulation of phospho-ERK1/2 in head and neck cancers. *PLoS Biol* **2018**, *16*, e2006624, doi:10.1371/journal.pbio.2006624.
 32. Mueller, S.; Engleitner, T.; Maresch, R.; Zukowska, M.; Lange, S.; Kaltenbacher, T.; Konukiewitz, B.; Ollinger, R.; Zwiebel, M.; Strong, A.; Yen, H.Y.; Banerjee, R.; Louzada, S.; Fu, B.; Seidler, B.; Gotzfried, J.; Schuck, K.; Hassan, Z.; Arbeiter, A.; Schonhuber, N.; Klein, S.; Veltkamp, C.; Friedrich, M.; Rad, L.; Barenboim, M.; Ziegenhain, C.; **Hess, J.**; Dovey, O.M.; Eser, S.; Parekh, S.; Constantino-Casas, F.; de la Rosa, J.; Sierra, M.I.; Fraga, M.; Mayerle, J.; Kloppel, G.; Cadinanos, J.; Liu, P.; Vassiliou, G.; Weichert, W.; Steiger, K.; Enard, W.; Schmid, R.M.; Yang, F.; Unger, K.; Schneider, G.; Varela, I.; Bradley, A.; Saur, D.; Rad, R. Evolutionary routes and KRAS dosage define pancreatic cancer phenotypes. *Nature* **2018**, *554*, 62-68, doi:10.1038/nature25459.
 33. Maihoefer, C.; Schüttrumpf, L.; Macht, C.; Pflugradt, U.; **Hess, J.**; Schneider, L.; Woischke, C.; Walch, A.; Baumeister, P.; Kirchner, T.; Zitzelsberger, H.; Belka, C.; Ganswindt, U. Postoperative (chemo) radiation in patients with squamous cell cancers of the head and neck - clinical results from the cohort of the clinical cooperation group "Personalized Radiotherapy in Head and Neck Cancer". *Radiation oncology* **2018**, *13*, 123, doi:10.1186/s13014-018-1067-1.
 34. Baumeister, P.; Hollmann, A.; Kitz, J.; Afthonidou, A.; Simon, F.; Shakhtour, J.; Mack, B.; Kranz, G.; Libl, D.; Leu, M.; Schirmer, M.A.; Canis, M.; Belka, C.; Zitzelsberger, H.; Ganswindt, U.; **Hess, J.**; Jakob, M.; Unger, K.; Gires, O. High Expression of EpCAM and Sox2 is a Positive Prognosticator of Clinical Outcome for Head and Neck Carcinoma. *Sci Rep* **2018**, *8*, 14582, doi:10.1038/s41598-018-32178-8.
 35. Steens, J.; Zuk, M.; Benchellal, M.; Bornemann, L.; Teichweyde, N.; Hess, J.; Unger, K.; Gorgens, A.; Klump, H.; Klein, D. In Vitro Generation of Vascular Wall-Resident Multipotent Stem Cells of Mesenchymal Nature from Murine Induced Pluripotent Stem Cells. *Stem Cell Reports* **2017**, *8*, 919-932, doi:10.1016/j.stemcr.2017.03.001.
 36. Michna, A.; Braselmann, H.; Selmansberger, M.; Dietz, A.; **Hess, J.**; Gomolka, M.; Hornhardt, S.; Bluthgen, N.; Zitzelsberger, H.; Unger, K. Natural Cubic Spline Regression Modeling Followed by Dynamic Network Reconstruction for the Identification of Radiation-Sensitivity Gene Association Networks from Time-Course Transcriptome Data. *PLoS One* **2016**, *11*, e0160791, doi:10.1371/journal.pone.0160791.

37. Summerer, I.; **Hess, J.**; Pitea, A.; Unger, K.; Hieber, L.; Selmansberger, M.; Lauber, K.; Zitzelsberger, H. Integrative analysis of the microRNA-mRNA response to radiochemotherapy in primary head and neck squamous cell carcinoma cells. *BMC genomics* **2015**, *16*, 654, doi:10.1186/s12864-015-1865-x.
38. Selmansberger, M.; Kaiser, J.C.; **Hess, J.**; Guthlin, D.; Likhtarev, I.; Shpak, V.; Tronko, M.; Brenner, A.; Abend, M.; Blettner, M.; Unger, K.; Jacob, P.; Zitzelsberger, H. Dose-dependent expression of CLIP2 in post-Chernobyl papillary thyroid carcinomas. *Carcinogenesis* **2015**, *36*, 748-756, doi:10.1093/carcin/bgv043.
39. Selmansberger, M.; Braselmann, H.; **Hess, J.**; Bogdanova, T.; Abend, M.; Tronko, M.; Brenner, A.; Zitzelsberger, H.; Unger, K. Genomic copy number analysis of Chernobyl papillary thyroid carcinoma in the Ukrainian-American Cohort. *Carcinogenesis* **2015**, *36*, 1381-1387, doi:10.1093/carcin/bgv119.
40. Sass, S.; Pitea, A.; Unger, K.; **Hess, J.**; Mueller, N.S.; Theis, F.J. MicroRNA-Target Network Inference and Local Network Enrichment Analysis Identify Two microRNA Clusters with Distinct Functions in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Int J Mol Sci* **2015**, *16*, 30204-30222, doi:10.3390/ijms161226230.
41. Gross, C.; Steiger, K.; Sayyed, S.; Heid, I.; Feuchtinger, A.; Walch, A.; **Hess, J.**; Unger, K.; Zitzelsberger, H.; Settles, M.; Schlitter, A.M.; Dworniczak, J.; Altomonte, J.; Ebert, O.; Schwaiger, M.; Rummeny, E.; Steingotter, A.; Esposito, I.; Braren, R. Model Matters: Differences in Orthotopic Rat Hepatocellular Carcinoma Physiology Determine Therapy Response to Sorafenib. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **2015**, *21*, 4440-4450, doi:10.1158/1078-0432.CCR-14-2018.
42. Braselmann, H.; Michna, A.; **Hess, J.**; Unger, K. CFAssay: statistical analysis of the colony formation assay. *Radiation oncology* **2015**, *10*, 223, doi:10.1186/s13014-015-0529-y.
43. Summerer, I.; Niyazi, M.; Unger, K.; Pitea, A.; Zangen, V.; **Hess, J.**; Atkinson, M.J.; Belka, C.; Moertl, S.; Zitzelsberger, H. Changes in circulating microRNAs after radiochemotherapy in head and neck cancer patients. *Radiation oncology* **2013**, *8*, 296, doi:10.1186/1748-717X-8-296.

4.3 Übersichtsartikel / Reviews

1. Hall, J.; Jeggo, P.A.; West, C.; Gomolka, M.; Quintens, R.; Badie, C.; Laurent, O.; Aerts, A.; Anastasov, N.; Azimzadeh, O.; Azizova, T.; Baatout, S.; Baselet, B.; Benotmane, M.A.; Blanchardon, E.; Gueguen, Y.; Haghdooost, S.; Harms-Ringdahl, M.; **Hess, J.**; Kreuzer, M.; Laurier, D.; Macaeva, E.; Manning, G.; Pernot, E.; Ravanat, J.L.; Sabatier, L.; Tack, K.; Tapio, S.; Zitzelsberger, H.; Cardis, E.

Ionizing radiation biomarkers in epidemiological studies - An update. *Mutat Res Rev Mutat Res* **2017**, 771, 59-84, doi:10.1016/j.mrrev.2017.01.001.

2. Wunderlich, R.; Ruehle, P.F.; Deloch, L.; Unger, K.; **Hess, J.**; Zitzelsberger, H.; Lauber, K.; Frey, B.; Gaip, U.S. Interconnection between DNA damage, senescence, inflammation, and cancer. *Front Biosci (Landmark Ed)* **2017**, 22, 348-369, doi:10.2741/4488.

4.4 Sonstige Veröffentlichungen (Editorial)

1. Badie, C.; **Hess, J.**; Zitzelsberger, H.; Kulka, U. Established and Emerging Biomarkers of Radiation Exposure. *Clin Oncol (R Coll Radiol)* **2016**, 28, 619-621, doi:10.1016/j.clon.2016.06.002.

5 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mich auf meinem Weg zu meiner Habilitation begleitet und unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Horst Zitzelsberger für seine jahrelange Unterstützung meines beruflichen und wissenschaftlichen Werdegangs.

Herzlichen Dank an Herrn Prof. Dr. Claus Belka für die Betreuung meiner Habilitation und seine Unterstützung in den vergangenen Jahren.

Ein großer Dank gilt allen Kolleginnen und Kollegen aus der Abteilung Translationale Metabolische Onkologie am Helmholtz Zentrum München sowie allen Kooperationspartnern, insbesondere an den LMU-Kliniken für Strahlentherapie & Radioonkologie und Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde sowie am LMU-Institut für Pathologie.

Ganz besonders möchte ich mich bei Prof. Dr. Kristian Unger für die hervorragende Zusammenarbeit und seine Freundschaft bedanken.

Meiner lieben Familie danke ich von ganzem Herzen für ihre Liebe und Unterstützung. Ohne euch wäre das alles nicht möglich gewesen!

6 Fundstellen der zugrundeliegenden Originalarbeiten

1. Maihoefer, C.; Schüttrumpf, L.; Macht, C.; Pflugradt, U.; **Hess, J.**; Schneider, L.; Woischke, C.; Walch, A.; Baumeister, P.; Kirchner, T.; Zitzelsberger, H.; Belka, C.; Ganswindt, U. Postoperative (chemo) radiation in patients with squamous cell cancers of the head and neck - clinical results from the cohort of the clinical cooperation group "Personalized Radiotherapy in Head and Neck Cancer". *Radiation oncology* **2018**, *13*, 123, doi:10.1186/s13014-018-1067-1.
2. Schüttrumpf, L.; Marschner, S.; Scheu, K.; **Hess, J.**; Rietzler, S.; Walch, A.; Baumeister, P.; Kirchner, T.; Ganswindt, U.; Zitzelsberger, H.; Belka, C.; Maihoefer, C. Definitive chemoradiotherapy in patients with squamous cell cancers of the head and neck - results from an unselected cohort of the clinical cooperation group "Personalized Radiotherapy in Head and Neck Cancer". *Radiation oncology* **2020**, *15*, 7, doi:10.1186/s13014-019-1452-4.
3. **Hess, J.**; Unger, K.; Orth, M.; Schotz, U.; Schüttrumpf, L.; Zangen, V.; Gimenez-Aznar, I.; Michna, A.; Schneider, L.; Stamp, R.; Selmansberger, M.; Braselmann, H.; Hieber, L.; Drexler, G.A.; Kuger, S.; Klein, D.; Jendrossek, V.; Friedl, A.A.; Belka, C.; Zitzelsberger, H.; Lauber, K. Genomic amplification of Fanconi anemia complementation group A (FancA) in head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC): Cellular mechanisms of radioresistance and clinical relevance. *Cancer Lett* **2017**, *386*, 87-99, doi:10.1016/j.canlet.2016.11.014.
4. Wintergerst, L.; Selmansberger, M.; Maihoefer, C.; Schüttrumpf, L.; Walch, A.; Wilke, C.; Pitea, A.; Woischke, C.; Baumeister, P.; Kirchner, T.; Belka, C.; Ganswindt, U.; Zitzelsberger, H.; Unger, K.; **Hess, J.** A prognostic mRNA expression signature of four 16q24.3 genes in radio(chemo)therapy-treated head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC). *Mol Oncol* **2018**, *12*, 2085-2101, doi:10.1002/1878-0261.12388.
5. **Hess, J.**; Unger, K.; Maihoefer, C.; Schüttrumpf, L.; Wintergerst, L.; Heider, T.; Weber, P.; Marschner, S.; Braselmann, H.; Samaga, D.; Kuger, S.; Pflugradt, U.; Baumeister, P.; Walch, A.; Woischke, C.; Kirchner, T.; Werner, M.; Werner, K.; Baumann, M.; Budach, V.; Combs, S.E.; Debus, J.; Grosu, A.L.; Krause, M.; Linge, A.; Rodel, C.; Stuschke, M.; Zips, D.; Zitzelsberger, H.; Ganswindt, U.; Henke, M.; Belka, C. A Five-MicroRNA Signature Predicts Survival and Disease Control of Patients with Head and Neck Cancer Negative for HPV Infection. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research* **2019**, *25*, 1505-1516, doi:10.1158/1078-0432.CCR-18-0776.
6. Weber, P.*; Kunstner, A.*; **Hess, J.***; Unger, K.*; Marschner, S.; Idel, C.; Ribbat-Idel, J.; Baumeister, P.; Gires, O.; Walz, C.; Rietzler, S.; Valeanu, L.; Herkommer, T.; Kreutzer, L.; Klymenko, O.; Drexler, G.; Kirchner, T.; Maihofer, C.; Ganswindt, U.; Walch, A.; Sterr, M.; Lickert, H.; Canis, M.; Rades, D.; Perner, S.; Berriel Diaz, M.; Herzig, S.; Lauber, K.; Wollenberg, B.; Busch, H.; Belka, C.; Zitzelsberger, H. Therapy-Related Transcriptional Subtypes in Matched Primary and Recurrent Head and Neck Cancer. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research* **2022**, *28*, 1038-1052, doi:10.1158/1078-0432.CCR-21-2244. *geteilte Erstautorenschaft
7. **Hess, J.**; Unger, K.; Maihoefer, C.; Schüttrumpf, L.; Weber, P.; Marschner, S.; Wintergerst, L.; Pflugradt, U.; Baumeister, P.; Walch, A.; Woischke, C.; Kirchner, T.; Werner, M.; Sorensen, K.; Baumann, M.; Tinhofer, I.; Combs, S.E.; Debus, J.; Schafer, H.; Krause, M.; Linge, A.; von der Grun, J.; Stuschke, M.; Zips, D.; Canis, M.; Lauber, K.; Ganswindt, U.; Henke, M.; Zitzelsberger, H.; Belka, C. Integration of p16/HPV DNA Status with a 24-miRNA-Defined Molecular Phenotype Improves Clinically Relevant Stratification of Head and Neck Cancer Patients. *Cancers (Basel)* **2022**, *14*, doi:10.3390/cancers14153745.