

**Aus dem Lehrstuhl
für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie
Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert
der Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg**

**Die Expression einer Gensignatur, die mit der Produktion von extrazellulären
Vesikeln korreliert, prägt die Immunlandschaft des Kopf-Hals-
Plattenepithelkarzinoms**

**Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Zahnmedizin (Dr. med. dent.)**

**der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg**

**vorgelegt von
Isabella Maria Standhartinger**

**Aus dem Lehrstuhl
für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie
Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert
der Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg**

**Die Expression einer Gensignatur, die mit der Produktion von extrazellulären
Vesikeln korreliert, prägt die Immunlandschaft des Kopf-Hals-
Plattenepithelkarzinoms**

**Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Zahnmedizin (Dr. med. dent.)**

**der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg**

**vorgelegt von
Isabella Maria Standhartinger**

Dekan:	Prof. Dr. Dirk Hellwig
1. Berichterstatter:	PD Dr. Dr. Johannes Meier
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. Daniel Wolff
Tag der mündlichen Prüfung:	21.02.2025

Vorwort

Teile der Ergebnisse dieser Dissertation wurden in folgenden Fachartikeln veröffentlicht:

Kallinger I*, Rubenich DS*, Głuszek A*, Kulkarni A, Spanier G, Spoerl S, Taxis J, Poeck H, Szczepański MJ, Ettl T, Reichert TE, Meier J, Braganhol E, Ferris RL, Whiteside TL, Ludwig N: Tumor gene signatures that correlate with release of extracellular vesicles shape the immune landscape in head and neck squamous cell carcinoma. *Clinical and Experimental Immunology*. 213:1(2023) 102-113

*geteilte Erstautorschaft

Ludwig N, Yerneni SS, Azambuja JH, Pietrowska M, Widlak P, Hinck CS, Głuszek A, Szczepański MJ, Kärmer T, **Kallinger I**, Schulz D, Bauer RJ, Spanier G, Spörl S, Meier J, Ettl T, Razzo BM, Reichert TE, Hinck AP, Whiteside TL: TGFβ⁺ small extracellular vesicles from head and neck squamous cell carcinoma cells reprogram macrophages towards a pro-angiogenic phenotype. *Journal of Extracellular Vesicles*. 11:12(2022) e12294

Außerdem wurden Teile der Ergebnisse als Posterpräsentation auf dem 3rd International Symposium on Tumor-Host Interaction in Head and Neck Cancer 2022 in Essen, Deutschland präsentiert. Die Posterpräsentation wurde durch ein Stipendium vom Verein zur Förderung der wissenschaftlichen Zahnheilkunde in Bayern e.V. unterstützt.

1. Einleitung	5
1.1 Kopf-Hals-Karzinome.....	5
1.2 Exosomen.....	9
1.3 Immunantwort bei Patienten mit HNSCC.....	13
1.4 Bioinformatik.....	18
2. Material und Methoden.....	23
2.1 Ziel dieser Arbeit.....	24
2.2 Statistische Analyse	26
2.2.1 Protein-Protein-Interaktionen	26
2.2.2 Vergleich der Genexpression im Tumor- und normalen soliden Gewebe	27
2.2.3 Einfluss der Signatur auf die Überlebensprognose der Patienten.....	27
2.2.4 Einfluss der Signatur auf die Immunlandschaft	29
2.2.5 Einfluss von Mutationen im Tumorgewebe	31
2.2.6 Validierung der Ergebnisse	31
3. Ergebnisse	33
3.1 Betrachtung der Fathi-EVsig als Ganzes.....	33
3.1.1 Protein-Protein-Interaktionen	34
3.1.2 Vergleich der Genexpression der Signatur im Tumor- und normalen soliden Gewebe	36
3.1.3 Einfluss der Signatur auf die Überlebensprognose der Patienten.....	36
3.1.4 Einfluss der Signatur auf die Immunlandschaft	37
3.1.5 Einfluss von Mutationen im Tumorgewebe	46
3.2 Analyse der Fathi-EVsig unter Berücksichtigung des HPV-Infektionsstatus.....	47
3.2.1 Vergleich der Überlebensprognosen der Patienten beim HPV-positiven und HPV-negativen HNSCC.....	47
3.2.2 Vergleich der Immunlandschaft beim HPV-positiven und HPV-negativen HNSCC.....	50

3.3 Analyse der einzelnen Gene, die die Fathi-EVsig beinhaltet	59
3.3.1 Vergleich der Genexpression im Tumor- und normalen soliden Gewebe	59
3.3.2 Einfluss der Gene auf die Überlebensprognose der Patienten	60
3.3.3 Einfluss der Gene auf die Immunlandschaft.....	64
3.4 Validierung der Ergebnisse mit der Hurwitz-EVsig	67
3.4.1 Vergleich der Genexpression der Signatur im Tumor- und normalen soliden Gewebe	67
3.4.2 Einfluss der Signatur auf die Überlebensprognose der Patienten	68
3.4.3 Einfluss der Signatur auf die Immunlandschaft.....	71
4. Diskussion	73
5. Zusammenfassung.....	79
6. Literaturverzeichnis	80
7. Eidesstaatliche Erklärung.....	93
8. Danksagung	

1 Einleitung

Plattenepithelkarzinome stellen eine heterogene maligne Erkrankung dar (Mirza et al., 2019) und machen den größten Anteil aller bösartigen Tumoren im Kopf- und Halsbereich aus (Chen et al., 2008). Die 5-Jahres-Überlebensrate hat sich in den letzten Jahrzehnten nur geringfügig verbessert (Coordes et al., 2016), was die Notwendigkeit von Fortschritten im Verständnis der Tumorbilogie von Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinomen unterstreicht, um Verbesserungen der aktuellen Behandlungen zu erzielen.

Heutzutage wird ein Tumor nicht mehr als ein Großteil bösartiger Krebszellen angesehen, sondern als komplexe Tumormikroumgebung (TMU), in die andere Subpopulationen von Zellen, die durch Krebszellen umprogrammiert werden, rekrutiert werden, um eine selbstständige biologische Struktur zu bilden (Peltanova et al., 2019).

In der Tumorbilogie wird die Freisetzung kleiner extrazellulärer Vesikel, sogenannter Exosomen, durch Tumorzellen und deren Charakterisierung bei verschiedenen malignen Erkrankungen, einschließlich Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinomen, derzeit intensiv untersucht (Whiteside, 2017b). Exosomen leisten einen bedeutsamen Beitrag zur interzellulären Kommunikation und können funktionelle Veränderungen in der TMU hervorrufen (Ko et al., 2019).

In dieser Arbeit wurde ein bioinformatischer Ansatz verwendet, um die Rolle von Exosomen bei der Gestaltung der zellulären Zusammensetzung der TMU besser zu definieren. Es wurden zwei veröffentlichte Gensignaturen untersucht, deren Expression mit einer erhöhten Freisetzung von Exosomen aus Tumorzellen in Verbindung gebracht wurde (Fathi et al., 2021; Hurwitz, Rider, et al., 2016).

1.1 Kopf-Hals-Karzinome

Plattenepithelkarzinome des Kopf-Halsbereichs werden in der Literatur häufig auch als HNSCCs (Head and neck squamous cell carcinomas) bezeichnet und können

unterschiedliche anatomische Bereiche befallen, darunter die Schleimhäute der Mundhöhle, des Pharynx und des Larynx (Johnson et al., 2020). 95 % aller malignen Tumoren im Kopf-Hals-Bereich sind histologisch Plattenepithelkarzinome (Chen et al., 2008). Die restlichen 5 % Prozent verteilen sich auf maligne Lymphome, Sarkome, Adenokarzinome, maligne Melanome, Adenoid-zystische Karzinome, Mukoepidermoidkarzinome und andere Tumoren (Davies & Welch, 2006).

Weltweit wurden im Jahr 2018 über 890 000 neue Fälle registriert, wodurch das HNSCC an die sechste Stelle der weltweit häufigsten malignen Tumorerkrankungen gerückt ist (Johnson et al., 2020). In der Bundesrepublik Deutschland gab es 14 310 registrierte Neuerkrankungen im Jahr 2018, wobei mit 9 820 Patienten vorwiegend Männer betroffen waren. Außerdem wiesen Männer mit 52 % niedrigere relative 5-Jahres-Überlebensraten im Vergleich zu Frauen mit 62 % auf (Erdmann et al., 2021). Die relative 5-Jahres-Überlebensrate gibt die Überlebensaussichten eines Patienten mit der Diagnose Krebs innerhalb von fünf Jahren in Relation zum erwarteten Alter eines Patienten in der Bevölkerung ohne Krebsdiagnose gleichen Alters und Geschlechts an. Das bedeutet, dass innerhalb von fünf Jahren nach einer Krebsdiagnose fast doppelt so viele Patienten verstorben sind, wie ohne Krebsdiagnose zu erwarten gewesen wäre (Erdmann et al., 2021). Obwohl intensiv an der Kopf-Hals-Tumorgenese geforscht wird und neue Therapiekonzepte entwickelt werden, hat sich diese durchschnittliche 5-Jahres-Überlebenszeit seit Jahrzehnten kaum gebessert (Stephen et al., 2013; Leemans et al., 2011; Coordes et al., 2016).

Verschiedene Risikofaktoren können eine spontane Anhäufung von genetischen Veränderungen hervorrufen und die Entstehung bösartiger Tumoren im Kopf- und Halsbereich begünstigen (Cillo et al., 2020). Dazu zählen der Tabakkonsum, regelmäßiger Alkoholkonsum und die Exposition gegenüber Umweltschadstoffen (Johnson et al., 2020). Interessanterweise verstärkt der Alkoholkonsum die negativen Auswirkungen des Rauchens auf synergistische Weise, wodurch das Krebsrisiko weiter steigt (Johnson et al., 2020). Auch das Kauen der Betelnuss (Chin et al., 2006), sowie die Ernährung (Bosetti et al., 2003) und bestimmte Erbkrankheiten wie die Fanconi-Anämie können die Entstehung eines Plattenepithelkarzinoms begünstigen (Leemans et al., 2011).

Eine Untergruppe der HNSCCs wird durch die Infektion mit dem humanen Hochrisiko-Papillomavirus (HPV) verursacht (Leemans et al., 2011). HPV ist ein unbehülltes und zirkuläres doppelsträngiges DNA-Virus, das sexuell übertragen wird und zu den Hauptursachen für Cervixkarzinome zählt (Leemans et al., 2011). Positive Assoziationen wurden für HPV-16 und andere Hochrisiko-Typen einschließlich HPV-18, HPV-33 und HPV-52 beobachtet (Michaud et al., 2014). Der HPV-Status hat einen großen Einfluss auf das Überleben der Patienten. HPV-negative HNSCCs sind mit einem verringerten Gesamtüberleben assoziiert, obwohl die Patienten mit einem HPV-positiven HNSCC eher Lymphknotenmetastasen aufweisen (Pai & Westra, 2009).

Die Ursprungszellen vom HNSCC sind Schleimhautepithelzellen, die auf ihrem Weg zur Tumorbildung eine geordnete Abfolge von Schritten durchlaufen. Histologisch erkennt man zuerst eine Hyperplasie der Epithelzellen, der eine Dysplasie (Johnson et al., 2020) mit vermehrten Mitosen der Zellen folgt (Odell et al., 2021). Ein Fortschreiten der Erkrankung führt zum Carcinoma in situ (Johnson et al., 2020). Tumorzellen können in weiterer Folge in benachbarte Strukturen, wie in die Skelettmuskulatur oder in die Schädel- und Gesichtsknochen und in die Gesichtshaut eindringen. Die Invasion kann mit einer Tumorausdehnung entlang von Nerven und/oder einer Beteiligung der Lymphgefäße einhergehen (Pai & Westra, 2009).

Die Früherkennung ist von zentraler Bedeutung, da die Heilungsaussichten der Patienten bei Frühbefunden günstiger sind, als die der Patienten mit Tumoren im fortgeschrittenen Stadium (Wolff et al., 2021). Stadium und HPV-Status gelten als die wichtigsten Determinanten der HNSCC-Prognose. Die Stadieneinteilung vom HNSCC umfasst die Klassifizierung der Erkrankung innerhalb jeder klassischen anatomischen Unterregion (Mundhöhle, Oropharynx, Hypopharynx oder Larynx) gemäß der TNM-Klassifizierung (Johnson et al., 2020).

Die Abweichung des Tumorgewebes vom Normalgewebe wird im histologischen Grading erfasst und vom Pathologen ermittelt. Veränderungen im Gewebe können entsprechend der zellulären Differenzierung in Grade eingeteilt werden. Niedriggradige Tumoren, die als gut differenziert gelten, werden dem Grad G1 zugeordnet. Die Zellen und Gewebestrukturen sind wenig verändert, wohingegen hochgradige Tumoren eine abnormale zelluläre Organisation, vermehrte Mitosen

sowie Kernvergrößerungen mit Pleomorphismus aufweisen (G2, G3, G4). Hochgradige Tumoren sind typischerweise aggressiver (Telloni, 2017) und ein höheres Grading ist mit einer schlechteren Prognose verbunden (Wolff et al., 2021).

Die Beurteilung durch ein multidisziplinäres Team ist bei der Wahl der Behandlung von Plattenepithelkarzinomen des Kopfes und Halses sehr wichtig, da die Therapie je nach Krankheitsstadium, anatomischer Lage und chirurgischer Zugänglichkeit unterschiedlich ist (Chow, 2020). Zu den Behandlungsmöglichkeiten zählen die chirurgische Therapie (Caudell et al., 2022), die Strahlentherapie, die Chemotherapie und die Immuntherapie (Machiels et al., 2020). Da Krebserkrankungen der Mundhöhle transoral leicht zugänglich sind, wird in der Regel eine chirurgische Resektion vorgenommen (Chow, 2020), während die Strahlentherapie bei Krebserkrankungen des Rachens und des Kehlkopfes häufiger zum Einsatz kommt (Johnson et al., 2020).

Gemäß der Leitlinie für Mundhöhlenkarzinome der Deutschen Gesellschaft für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie sollte bei der chirurgischen Resektion ein peritumoraler Sicherheitsabstand von mindestens 5 mm eingehalten werden, um das Rezidivrisiko zu reduzieren. Bei Tumoren im fortgeschrittenen Stadium ist zusätzlich eine postoperative Therapie anzustreben. Da das HNSCC in 20 bis 40 % der Fälle mit einer Metastasierung in die Halslymphknoten einhergeht, ist häufig zusätzlich zur Tumorsektion eine Halslymphknotenausräumung (Neck Dissection) notwendig. Die Strahlentherapie kann mit einer kurativen Intention zur Verbesserung der lokalen Tumorkontrolle nach oder vor einer chirurgischen Therapie (adjuvante oder neoadjuvante Strahlentherapie) sowie zur Linderung von tumorbedingten Symptomen (palliative Strahlentherapie) eingesetzt werden. Zudem kann sie mit einer Chemotherapie kombiniert werden. Eine primäre Radiochemotherapie soll bei fortgeschrittenen, inoperablen und nicht metastasierten Mundhöhlenkarzinomen einer alleinigen Strahlentherapie vorgezogen werden. Eine alleinige Chemotherapie stellt beim Kopf-Hals-Karzinom eine palliative Therapiemöglichkeit dar (Wolff et al., 2021).

Die Gabe von Immuncheckpoint-Inhibitoren (einschließlich Nivolumab und Pembrolizumab) ist eine weitere Behandlungsmethode, die bei Patienten mit einem fortgeschrittenen oder rezidivierenden HNSCC eingesetzt werden kann (Johnson et al., 2020). Der PD-1-Rezeptor (PD-1) befindet sich auf T-Zellen und interagiert mit

seinem Liganden (PD-L1), wodurch die T-Zell-Reaktion gehemmt wird. PD-L1 kann auf der Oberfläche von Tumorzellen, Immunzellen oder anderen Zellen in der TMU exprimiert werden, liegt aber auch in extrazellulärer Form vor (Daassi et al., 2020). Durch eine Blockade dieser Interaktion mit einem Immun-Checkpoint-Antikörper, der an diese Rezeptoren bindet, kann die antitumorale Wirkung der T-Zellen wiederhergestellt werden (Yi et al., 2018). Der Großteil der Patienten, etwa 85 bis 95 %, spricht jedoch nicht auf diese Behandlung an oder es folgt eine Krankheitsprogression und schließlich der Tod durch die Krankheit (Chow, 2020).

1.2 Exosomen

Als Reaktion auf physiologische und/oder pathologische Bedingungen kommunizieren alle Zellen im Körper miteinander über die Sekretion einer heterogenen Mischung aus extrazellulären Vesikeln (Atay & Godwin, 2014), die anhand unterschiedlicher Größe und unterschiedlicher Biogenese in drei Gruppen eingeteilt werden (Sedgwick & D'Souza-Schorey, 2018). Apoptotische Körperchen weisen eine Größe von 500 bis 2000 Nanometer auf und sind die größten Vesikel. Sie entstehen beim kontrollierten Zelltod durch Membran-Blebbing. Mikrovesikel werden direkt aus der Zellmembran ausgestülpt und haben eine Größe von 50 bis 1000 Nanometer (Reiners et al., 2017). Exosomen sind kleine Vesikel endosomalen Ursprungs (Eldh et al., 2010) mit einem Durchmesser von 30 bis 150 Nanometer (Vlassov et al., 2014). Exosomen werden von allen Zellen, auch von Tumorzellen, ausgeschüttet und wurden in vielen biologischen Flüssigkeiten, wie Plasma, Urin, Speichel und Muttermilch, gefunden (Eldh et al., 2010).

Neue Erkenntnisse deuten darauf hin, dass Exosomen an normalen physiologischen Aktivitäten beteiligt sind und die Differenzierung und Reparatur von Gewebe, die Entwicklung blutbildender Stammzellen, die Blutgerinnung und die Immunüberwachung beeinflussen. Sie sind auch an verschiedenen pathologischen Prozessen beteiligt, darunter am Tumorwachstum und an der Metastasierung (Whiteside, 2017a). Von besonderer Bedeutung für die pathologische Rolle von Exosomen ist ihre Wirkung auf das Immunsystem des Wirts. Exosomen, die von

bösartigen oder virusinfizierten Zellen produziert werden, transportieren immunsuppressive Komponenten und führen nicht nur lokal am Krankheitsherd, sondern auch systemisch zu einer Funktionsstörung von Immuneffektorzellen (Whiteside, 2017a).

Das endosomale System umfasst primäre endozytotische Vesikel, frühe Endosomen, späte Endosomen (Denzler et al., 2000), die auch multivesikuläre Körper (MVBs) genannt werden (Mashouri et al., 2019), und Lysosomen (Denzler et al., 2000). Ein frühes Endosom bildet sich durch die Fusion von endozytotischen Vesikeln (Mashouri et al., 2019). Durch eine Reihe von Einstülpungen bilden sich zahlreiche intraluminale Vesikel und ein MVB entsteht (Whiteside, 2017a; Cocucci & Meldolesi, 2015). Danach erreichen die MVBs ihren intrazellulären Bestimmungsort. Sie können gezwungen sein durch Autophagie-verwandte Proteine mit Lysosomen zu fusionieren und aufgrund der ubiquitären Fracht, die sie enthalten, abgebaut zu werden oder alternativ zur Plasmamembran wandern und mit dieser fusionieren. Durch die Fusion mit der Plasmamembran werden die intraluminalen Vesikel (ILVs) als Exosomen in den Extrazellulärraum freigesetzt (Mashouri et al., 2019).

Exosomen bestehen aus einer Phospholipid-Doppelschichtmembran (Yuana et al., 2013) und tragen eine komplexe Fracht von Proteinen, Lipiden, Nukleinsäuren und löslichen Faktoren, wie Zytokine, Chemokine und Enzyme (Robbins & Morelli, 2014). Der Inhalt der Exosomen ist heterogen und hängt von der Herkunft der Zellen und ihrem physiologischen oder pathologischen Zustand ab (Guo et al., 2017).

Die am häufigsten in Exosomen identifizierten Proteine sind Membran- und Fusionsproteine, Tetraspanine, Hitzeschockproteine, Proteine der Exosomen-Biogenese (ALIX, TSG101, Syntenin-1) sowie Proteine zur Regulierung des Zytoskeletts und der Signaltransduktion (Syntenin, β -Catenin) (Atay & Godwin, 2014). Exosomen sind auch reich an Lipiden, bei denen es sich vorwiegend um Cholesterin, Bisphosphate, Sphingo- und Phospholipide handelt (Whiteside, 2018). Darüber hinaus können Exosomen genetisches Material wie mRNA, lange nicht-kodierende RNA, microRNA und doppelsträngige DNA enthalten (Guo et al., 2017). Die bislang beschriebenen Proteine, RNAs und Lipide wurden in den Datenbanken ExoCarta (<http://exocarta.org>) und Vesiclepedia (<http://www.microvesicles.org>) erfasst (Reiners et al., 2017).

Die Effekte der Exosomen werden auf unterschiedliche Art und Weise vermittelt. Entweder durch die Bindung an Oberflächenrezeptoren auf der Zelle, was eine Aktivierung der Signaltransduktion zur Folge hat, oder durch den Transfer von Proteinen und Nukleinsäuren in die Zelle. Dies erfolgt entweder durch Fusion mit der Plasmamembran, wodurch die Fracht der Exosomen in das Zytoplasma der Zielzelle entlassen wird, oder durch Endozytose, bei der zunächst das intakte extrazelluläre Vesikel phagozytiert und anschließend die Fracht der Exosomen ins Zytoplasma freigesetzt wird (Reiners et al., 2017; Whiteside, 2017a). Dadurch kann die Funktion der Empfängerzelle umprogrammiert werden (Whiteside, 2018b).

Obwohl die Zusammensetzung der Vesikel sehr variiert, lassen sich Exosomen oft anhand ihrer Fracht dem abstammenden Zelltyp zuordnen. Tumor-Exosomen (TEX) tragen meist Tumorantigene (TAs) und häufig immunsuppressive Proteine, darunter den Transforming growth factor beta (TGF β) und Todesrezeptor-Liganden wie FasL oder TRAIL (Reiners et al., 2017; Gutiérrez-Vázquez et al., 2013). Eine Inhibition der Immunantwort wird für TEX sehr häufig beschrieben (Reiners et al., 2017). TEX können bei Krebserkrankungen maligne Informationen vom Tumor zu Zellen transportieren, die sich in der Nähe des Tumors oder an entfernten Orten befinden (Whiteside, 2018), einschließlich zu Zellen des Knochenmarks und des lymphatischen Systems (N. Ludwig et al., 2022). Dieser Informationstransfer führt zur Progression (Whiteside, 2017a), Invasion und Metastasierung des Tumors (Atay & Godwin, 2014) und fördert die Angiogenese (N. Ludwig et al., 2018). Dadurch wird die TMU in ein tumorförderndes Milieu umgewandelt. Dieser Prozess wird als „Reprogrammierung“ bezeichnet (Whiteside, 2018b). Immunzellen werden umprogrammiert, wodurch es zu einer Unterdrückung von Anti-Tumor-Immunantworten kommt (Whiteside, 2017a).

Die Exosomen-Sekretion ist eine normale physiologische Aktivität. Zellen, die Stress ausgesetzt sind oder sich in einem pathologischen Zustand befinden, setzen jedoch stark erhöhte Mengen an Exosomen frei (Whiteside, 2017a). Somit ist der Exosomen-Spiegel im Plasma oder in anderen Körperflüssigkeiten von Krebspatienten erhöht (Whiteside, 2017b), wodurch sich eine Möglichkeit der potentiellen Verwendung von Exosomen als Biomarker bei der Diagnose und Therapie von Krankheiten ergibt (Lorenc et al., 2020).

In dieser Arbeit wurden Gene analysiert, die an verschiedenen Stadien der Biogenese von Exosomen beteiligt sind. Hauptsächlich erfolgt die Transportierung der Proteine in die ILVs über den für den Transport erforderlichen endosomalen Sortierkomplex (ESCRT, endosomal sorting complexes required for transport). Am ESCRT-abhängigen Weg sind die vier verschiedene Proteinkomplexe ESCRT-0, -I, -II, -III beteiligt. Die Proteinkomplexe haben unterschiedliche Aufgaben: ESCRT-0 kann ubiquitinierte Proteine binden und transportiert diese zum Endosom. ESCRT-I und ESCRT-II veranlassen die Einstülpung der endosomalen Membran und ESCRT-III spielt eine Rolle bei der Deubiquitinierung der Proteine und der Abschnürung von Vesikeln in das Lumen des MVBS. Die Hilfsproteine ALIX und TSG101 unterstützen diese Prozesse (Reiners et al., 2017). Die **Tabelle 1** gibt einen Überblick über die ESCRT-Komplex-assoziierten Proteine, die die analysierte Gensignatur in dieser Arbeit beinhaltet. ESCRT-unabhängige Beladungen der Proteine in die ILVs erfolgen über Ceramid-abhängige und Lipid-Affinitäts-gesteuerte Aufnahmemechanismen (Reiners et al., 2017).

Tab. 1: Die ESCRT-Komplex-assoziierten Proteine.

ESCRT-0	HGS, STAM1
ESCRT-I	TSG101
ESCRT-III	CHMP4C
Hilfsproteine	VPS4-VTA1, PDCD6IP

Das Andocken von Vesikeln (Hurwitz, Conlon, et al., 2016) und die Fusion der MVBS mit der Plasmamembran erleichtern SNARE-Proteine (Mathieu et al., 2019; Mashouri et al., 2019).

RAB-Proteine, die größte Familie der kleinen GTPasen, kommen häufig in Exosomen vor (Mathivanan et al., 2010). Sie spielen eine Rolle bei der Übertragung von Vesikeln zwischen intrazellulären Kompartimenten (Mathieu et al., 2019), der Exozytose, der Motilität, dem Andocken und an der Fusion von Vesikeln (Hurwitz, Conlon, et al., 2016). Unter diesen stimulieren Rab11, Rab35 und Rab27 die Bindung und Fusion von MVBS an die Plasmamembran. Darüber hinaus wird angenommen, dass Rab2,

Rab4, Rab7 und Rab9 am vesikulären Transport und der Freisetzung von Exosomen beteiligt sind (Hurwitz, Conlon, et al., 2016).

1.3 Immunantwort bei Patienten mit HNSCC

Das Fortschreiten eines Tumors von einer einzelnen transformierten Zelle zu einer Masse von bösartigen Zellen ist ein über Monate oder sogar Jahre andauernder Prozess, der eine Reihe genetischer Veränderungen umfasst (Whiteside, 2010). Das Überleben und die Funktion des Tumors werden durch die TMU reguliert (Q. Wang et al., 2023). Es entsteht ein Kreislauf, indem das Immunsystem versucht den Tumor einzudämmen und die Tumorzellen für ihr Überleben die TMU durch diverse molekulare Mechanismen umprogrammieren (Whiteside, 2010).

Die TMU besteht aus verschiedenen Zelltypen wie Tumorzellen (Yunna et al., 2020), tumorinfiltrierenden Lymphozyten (TILs), einschließlich T-Zellen, B-Zellen und natürlichen Killerzellen (NK-Zellen), Makrophagen, Neutrophilen, dendritischen Zellen (DCs), myeloiden Suppressorzellen (MDSCs) (Johnson et al., 2020), regulatorischen T-Zellen (Tregs), tumor-assoziierten Fibroblasten (CAFs) (Peltanova et al., 2019) und Endothelzellen (Yunna et al., 2020). Außerdem sind nichtzelluläre Komponenten wie die extrazelluläre Matrix und lösliche Signale, vorhanden (Yunna et al., 2020). Diese Subpopulationen von Zellen interagieren sowohl untereinander als auch mit Krebszellen über komplexe Kommunikationsnetzwerke durch verschiedene abgesonderte Zytokine, Chemokine, Wachstumsfaktoren und Proteine der extrazellulären Matrix (Peltanova et al., 2019).

Antitumor-Immunantworten in der TMU werden hauptsächlich durch CD8(+) T-Zellen, NK-Zellen (Johnson et al., 2020), tumorassoziierte M1-Makrophagen (M1-TAMs) und tumorassoziierte N1-Neutrophile (N1-TANs) vermittelt (Peltanova et al., 2019). Erhöhte Konzentrationen von CD8(+) T-Zellen, die Antigene erkennen und die Apoptose abnormaler Zellen einleiten (Murphy & Weaver, 2017), und erhöhte Konzentrationen von NK-Zellen in der TMU sind mit einem verbesserten Überleben assoziiert (Johnson et al., 2020).

Im Gegensatz dazu werden Protumor-Immunantworten durch Tregs, MDSCs und M2-Makrophagen (Johnson et al., 2020), tumorassoziierte N2-Neutrophile (N2-TANs) und CAFs vermittelt (Peltanova et al., 2019). Erhöhte Konzentrationen von Tregs, MDSCs, Neutrophilen oder M2-Makrophagen werden bei HNSCC-Patienten mit einem fortgeschrittenen Stadium oder einer schlechten Prognose in Verbindung gebracht (Johnson et al., 2020).

T-Zellen sind wichtig bei der Antitumorimmunität. CD8(+) T-Zellen können von Tumorzellen vorgestellte Antigene erkennen und sie direkt abtöten, indem sie proinflammatorische Zytokine und zytolytische Granula freisetzen (Ruffin et al., 2023).

NK-Zellen gehören zur angeborenen Immunantwort (Wulff et al., 2009) und bilden eine erste Verteidigungslinie gegen Viren und Krebs (Guillerey, 2020). Sie können virusinfizierte oder transformierte Zellen durch die gezielte Freisetzung von lytischen Granula abtöten oder durch die Expression von Fas-Ligand oder TRAIL eine durch Todesrezeptoren vermittelte Apoptose auslösen (Prager & Watzl, 2019). Im Gegensatz zu CD8(+) T-Zellen sind NK-Zellen in der Lage, bösartige Zellen ohne vorherige Sensibilisierung zu erkennen und dagegen vorzugehen. NK-Zellen sind mit einem Repertoire an hemmenden und aktivierenden Oberflächenrezeptoren ausgestattet, die nach der Ligation aktivierende oder hemmende Signale liefern (Liu et al., 2021). Gesunde Zellen exprimieren keinen oder einen minimalen Gehalt an Liganden für die NK-Aktivierungsrezeptoren, aber hohe Konzentrationen von Molekülen des Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC-I) (Guillerey, 2020). Sobald ein passendes MHC-Molekül erkannt wird, erfolgt ein hemmender Reiz, woraufhin die Aktivierung von NK-Zellen verhindert wird (Peltanova et al., 2019). Dadurch werden hemmende Signale von den NK-Oberflächenrezeptoren geliefert. Umgekehrt verhält es sich mit Tumor- oder viral-infizierten Zellen. Sie haben die MHC-I-Expression herunterreguliert und den Gehalt an Liganden für NK-Zellaktivierungsrezeptoren hochreguliert, wodurch eine Aktivierung der NK-Zellen erfolgt (Liu et al., 2021). Die NK-Zell-Aktivierung und das Ergebnis der Interaktion der NK-Zellen mit einer potenziellen Zielzelle wird daher durch das feine Gleichgewicht zwischen aktivierenden und hemmenden Signalen, die die NK-Zellen von ihren Rezeptoren erhalten, genauestens geregelt (Guillerey, 2020).

B-Zellen können sich zu Plasmazellen differenzieren und Antikörper produzieren (Whiteside, 2010), die sich spezifisch gegen körperfremde Antigene richten. Ebenso können B-Zellen als Gedächtniszellen fungieren und sich an eine bereits abgelaufene Infektion erinnern, sodass die nächste Immunantwort schneller verläuft (Antwerpes et al., 2023). Intratumorale B-Zellen kommen auch in Tumoren vor. Die meisten B-Zellen befinden sich in tertiären lymphoiden Strukturen (TLO) in keimförmigen Zentren und breiten sich in das Tumorbett aus. Die produzierten Antikörper der Plasmazellen können Tumorantigene erkennen. Intratumorale oder peritumorale B-Zellen sind sowohl mit einer positiven Prognose als auch mit einer positiven Reaktion auf eine Immuntherapie verbunden (Engelhard et al., 2021).

DCs nehmen als antigenpräsentierende Zellen eine zentrale Rolle bei der Auslösung antigenspezifischer Immunität und Toleranz ein. Bei Krebs fungieren DCs als erste Verbindung zwischen der Onkogenese und dem Immunsystem des Wirts, um Krebszellen durch die Aktivierung von T-Zellen zu eliminieren. DCs sind in der Lage Tumorantigene einzufangen, verarbeiten diese und präsentieren sie den T-Zellen (Pitt et al., 2016) über ihre MHC-Klasse-I und MHC-Klasse-II-Moleküle (Villadangos & Schnorrer, 2007), um Antworten der CD8(+) T-Zellen gegen den Tumor zu erzeugen (Gerhard et al., 2021). Allerdings können solche T-Zell-Antworten nur dann erzeugt werden, wenn bestimmte zusätzliche Bedingungen in der lokalen Umgebung erfüllt sind. Diese Zustände bestehen aus lokal vorhandenen immunogenen Signalen, wie z. B. proinflammatorischen Zytokinen, Zellschaden-assoziierten molekularen Mustern (DAMPs) oder Pathogen-assoziierten molekularen Mustern (PAMPs) (Pitt et al., 2016).

Tregs sind eine Untergruppe der immunsuppressiven CD4(+) T-Zellen (Bayati et al., 2021). Normalerweise dienen sie als Immunbremse vor einer überschießenden Immunantwort (Peltanova et al., 2019). Sie wandern hauptsächlich in Entzündungsherde ein und unterdrücken verschiedene Arten von Effektor-Lymphozyten, einschließlich CD4(+) T-Helferzellen (TH) und CD8(+) T-Zellen (Togashi et al., 2019). Tregs im Tumor hemmen somit die Immunreaktion gegen den Tumor und unterdrücken die T-Zell-Aktivität durch den Verbrauch von Interleukin 2 (IL-2), dem Wachstumsfaktor der T-Zellen (De Meulenaere et al., 2017). Außerdem produzieren Tregs immunsuppressive Zytokine. Eine erhöhte Häufigkeit von Tregs

wurde nachweislich mit einem schlechten klinischen Ergebnis in Verbindung gebracht (Ma et al., 2017).

CAFs sind wesentliche Bestandteile der TMU und können das Tumorwachstum, die Angiogenese, die Invasion und die Metastasierung durch die Sekretion von Zytokinen, Chemokinen, Wachstumsfaktoren und Exosomen fördern. Diese Sekretion erleichtert nicht nur die Tumorphiliferation, sondern ermöglicht es auch den Tumorzellen, dem Immunsystem zu entkommen. CAFs sind in der Lage stromale extrazelluläre Matrix abzubauen, indem sie Matrixmetalloproteasen freisetzen und gleichzeitig neue Matrixproteine synthetisieren, um die Tumordinvasion und die Angiogenese strukturell zu unterstützen. CAFs können auch die Rekrutierung von Immuneffektorzellen wie CD8(+) T-Zellen ins Tumorgewebe durch die Sekretion verschiedener Chemokine einschränken (Mao et al., 2021).

MDSCs umfassen eine heterogene Population von unreifen, hemmenden Immunzellen in verschiedenen Stadien der Myelopoese. Diese Zellpopulation spielt eine entscheidende Rolle bei der negativen Regulierung der Immunantwort bei vielen pathologischen Erkrankungen, wie Krebs und Entzündungen, indem sie sowohl die adaptive als auch die angeborene Immunität hemmt. MDSCs unterdrücken bei Krebserkrankungen die T-Zellen, indem sie die inhibitorischen Faktoren Arginase 1 (Arg-1), Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS) und reaktive Sauerstoffspezies (ROS) produzieren (Davis et al., 2016). Da L-Arginin ein häufiges Substrat für Arg-1 und iNOS ist, wird die TMU durch Erschöpfung vieler Aminosäuren wie L-Arginin, L-Tryptophan und L-Cystein moduliert. Außerdem regulieren MDSCs auch die Aktivität von NK-Zellen und die Induktion von Tregs (Peltanova et al., 2019). Das Vorkommen von MDSCs innerhalb von HNSCCs wurde mit einer erhöhten Neigung zu Metastasen und Tumorrezidiven in Verbindung gebracht (Davis et al., 2016).

Makrophagen wehren in der Regel das Eindringen von Krankheitserregern ab (Yunna et al., 2020). Sie können sich zum Phänotyp M1 (tumorlimitierende Makrophagen) oder M2 (tumorverstärkende Makrophagen) entwickeln. M1-Makrophagen weisen Anti-Tumor-Eigenschaften auf (Davis et al., 2016), produzieren proinflammatorische Faktoren wie IL-6, IL-12 und den Tumornekrosefaktor (TNF α) (Yunna et al., 2020) und können das Primärtumorwachstum direkt beeinflussen (Davis et al., 2016). M2-

Makrophagen vermitteln antiinflammatorische Reaktionen, können geschädigtes Gewebe reparieren (Yunna et al., 2020) und unterstützen das Tumorwachstum durch die erhöhte Sekretion wachstumsfördernder (Davis et al., 2016) und entzündungshemmender Zytokine wie IL-1-Rezeptorantagonisten und TGFβ (Peltanova et al., 2019). Periphere Blutmonozyten aus dem Knochenmark werden in den Tumor rekrutiert und können sich als Reaktion auf Chemokine und Wachstumsfaktoren, die von Stroma- und Tumorzellen in der TMU produziert werden, zu tumor-assoziierten Makrophagen (TAMs) differenzieren (L. Yang & Zhang, 2017). TAMs tragen weitgehend zur Proliferation, Invasion und Metastasierung von Tumorzellen, zur Förderung der Tumorprogression, zur Angiogenese und zur Unterdrückung der Antitumor-Immunantwort von T-Zellen bei. Außerdem sind TAMs in der Lage, eine breite Palette verschiedener Aktivierungszustände zwischen M1 und M2 anzunehmen (Peltanova et al., 2019).

Neutrophile spielen eine wichtige Rolle bei der Immunantwort auf Infektionen und Verletzungen (Ng et al., 2024). Sie werden schnell zu sterilen oder infizierten Entzündungsstellen rekrutiert und zeigen eine hohe Plastizität und eine starke Wirkungsreaktion. Sie setzen Proteasen frei und produzieren große Mengen an reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), was zu Gewebeschäden führt. Ein erhöhtes Neutrophilen-Lymphozyten-Verhältnis gilt als prognostischer Indikator für Krebspatienten (Xiong et al., 2021). Neutrophile zeigen sowohl Pro- als auch Anti-Tumor-Eigenschaften. Diese Anti-Tumor- und Pro-Tumor-Phänotypen innerhalb der Neutrophilen-Population wurden als N1 bzw. N2 klassifiziert (Q. Wu et al., 2024).

HNSCCs entziehen sich der Immunüberwachung durch eine Reihe verschiedener Mechanismen (Johnson et al., 2020). Krebszellen neigen dazu, verschiedene immunsuppressive Moleküle zu exprimieren und zu nutzen, um Anti-Tumor-Immunantworten abzuschwächen (Whiteside, 2016). TEX sind mit immunsuppressiven Proteinen angereichert, darunter Todesrezeptor-Liganden wie FasL oder TRAIL, Prostaglandin E2 (PGE2) und Ektoenzyme CD39 und CD73, die die Bildung von Adenosin vermitteln (Whiteside, 2016). Die TMU ist reich an immunsuppressiven Wachstumsfaktoren und Zytokinen, von denen IL-6, IL-10, VEGF und TGFβ besonders wichtig sind (Johnson et al., 2020). Durch die Freisetzung der immunsuppressiven Moleküle wird gleichzeitig die Anti-Tumor-Wirkung von CD8(+) T-

Zellen und NK-Zellen gehemmt (Johnson et al., 2020). Zudem fördern die immunsuppressiven Moleküle die Rekrutierung und die Aktivität von MDSCs, Tregs und M2-Makrophagen (Johnson et al., 2020), die die Antitumor-Immunität herunterregulieren und es Tumoren ermöglichen, dem Wirtsimmunsystem zu entkommen (Whiteside, 2010). TEX vermitteln Pro-Tumor-Eigenschaften, indem sie Funktionsstörungen und Apoptose in CD8(+) T-Zellen induzieren (Whiteside, 2010).

In vielen Studien wurden Hinweise auf eine Immunzell dysfunktion innerhalb der TMU und im peripheren Blut von Patienten mit fortgeschrittenem HNSCC gefunden (Whiteside, 2010; Reichert et al., 2002; S. Ludwig et al., 2017). Darüber hinaus können Umgebungsfaktoren wie Hypoxie und ein hoher interstitieller Druck die Zytokin-Freisetzung negativ beeinflussen (Solomon et al., 2018) und lösliche Faktoren wie PGE2 und Adenosin die Immunzellfunktion herunterregulieren (Whiteside, 2010).

1.4 Bioinformatik

Die Bioinformatik ist eine interdisziplinäre Wissenschaft, die Methoden und Software-Tools zum Verständnis biologischer Daten erforscht und entwickelt. Sie vereint die Biologie, Informatik, Mathematik und die Statistik zur Analyse und Interpretation biologischer Daten (Tapprich et al., 2021).

Die Sequenzen von Nukleinsäuremolekülen sind von enormer Bedeutung, da nicht nur die genetische Information von Generation zu Generation weitergegeben wird, sondern auch die Funktion der Zellen durch die Transkription und die Translation beeinflusst wird (Long et al., 2018). Die DNA-Sequenzierung entschlüsselt die Reihenfolge der drei Milliarden DNA-Nukleotide in einem ganzen Genom oder ist auf bestimmte Bereiche von Interesse beschränkt, einschließlich aller 22.000 kodierenden Gene oder einer kleinen Anzahl einzelner Gene (Behjati & Tarpey, 2013).

Im Jahr 1977 wurden zwei bahnbrechende Artikel für DNA-Sequenzierungen veröffentlicht, die zur ersten Generation der Sequenzierungstechnologie zählen und sich in ihrer Technik unterscheiden (Pareek et al., 2011). Beide Methoden erfordern

einen mehrstufigen Prozess, der in etwa einer Woche abgeschlossen werden kann, sodass die gereinigte DNA für die Sequenzierung bereit ist (Mardis, 2017).

Die enzymatische Methode von Sanger wird auch Kettenabbruch-Synthese genannt und wurde von Sanger und Coulson bereits um 1975 entwickelt und 1977 mit der ersten vollständigen Sequenzierung eines Genoms vorgestellt (Long et al., 2018). Bei dieser Methode wird Didesoxynukleosidtriphosphat (ddNTP) zu einer der Basen (Adenin, Thymin, Cytosin oder Guanin) hinzugefügt, woraufhin keine Kettenverlängerung durch die DNA-Polymerase I mehr stattfinden kann (Sanger et al., 1977; Long et al., 2018).

Die Methode von Allan Maxam und Walter Gilbert wird auch chemische Degradations-DNA-Sequenzierungstechnik genannt (Long et al., 2018; Pareek et al., 2011). Radioaktive Phosphatmarkierungen werden an das 5'-Ende der DNA gebracht und es erfolgt eine basenspezifische, chemische Spaltung der DNA. In vier getrennten Ansätzen wird jeweils ein bestimmter Typ der vier vertretenen Basen vom Zucker-Phosphat-Rückgrat der DNA getrennt und danach wird der basenlose DNA-Strang an der basenlosen Stelle gespalten. In jedem der vier Ansätze entstehen Fragmente unterschiedlicher Länge, deren 3'-Ende stets an einer bestimmten Base gespalten wurde (Maxam & Gilbert, 1992; Long et al., 2018).

Anschließend erfolgt bei beiden zuvor beschriebenen Methoden eine Auftrennung der Fragmente durch eine denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Long et al., 2018).

Eine verbesserte Technologie zur DNA-Sequenzierung war die Einführung von Next-Generation-Sequencing (NGS)-Methoden im Jahr 2005 (Mardis, 2017). Diese Techniken zählen zur Sequenzierung der zweiten Generation (Pareek et al., 2011) und haben die Menge der pro Gerät erzeugten Sequenzierungsdaten deutlich erhöht und die Kosten für die Erzeugung von Sequenzierungsdaten drastisch gesenkt (Mardis, 2017). NGS-Methoden ermöglichen es, ein gesamtes menschliches Genom innerhalb eines einzigen Tages zu sequenzieren (Behjati & Tarpey, 2013).

Beim NGS gibt es verschiedene Verfahren, die angewendet werden können, darunter die Sequenzierung-durch-Synthese und die Sequenzierung-durch-Ligation (Mardis, 2017).

Ein Beispiel für die Sequenzierung-durch-Synthese ist die Illumina-Sequenzierung (Hu et al., 2021). Die genomische DNA wird in kleine Stücke fragmentiert und an beiden Enden werden Adapter ligiert. Jedes ligierte DNA-Fragment hybridisiert mit der komplementären Oligonukleotid-Sonde, das kovalent an die Oberfläche des Glasobjektträgers gebunden ist. Das gegenüberliegende Ende jeder der gebundenen einzelsträngigen DNA (ssDNA) hybridisiert ebenso mit einer komplementären Oligonukleotid-Sonde und bildet eine Brücke. Die ssDNAs werden durch Brückenamplifikation vervielfältigt (Verma et al., 2017), wodurch Kopien aus identischen Molekülen gebildet werden (Hu et al., 2021). Diese Amplifikation ist notwendig, um ausreichende Signalstärke zum Nachweis der Sequenzierungsreaktion für die abschließende Detektion zu erzeugen (Mardis, 2017). Die Sequenzierung basiert auf der optischen Auslesung des Einbaus fluoreszierender Nukleotide, die durch eine DNA-Polymerase an einen reversiblen Terminator gekoppelt sind. Bei jedem Sequenzierungszyklus wird ein einzelnes, fluoreszierend markiertes, an den reversiblen Terminator gebundenes dNTP in die Nukleinsäurekette eingebaut und das daraus resultierende Fluoreszenzsignal wird abgebildet. Der Terminator und der Fluoreszenzfarbstoff werden von dem eingebauten dNTP abgespalten, damit das nächste markierte dNTP hinzugefügt werden kann (Hu et al., 2021).

Die SOLiD-Sequenzierung verfolgt einen ähnlichen Ansatz, bestimmt die Reihenfolge der Nukleotide jedoch auf der Grundlage von Ligationen und nicht durch Nukleotidadditionen (Mardis, 2017). Oligonukleotid-Sonden binden an den DNA-Strang und identifizieren zwei nebeneinanderliegende Basen. Nach mehrfacher Wiederholung wird die gesamte Sequenz aus den überlappenden zwei-Basen Bereichen zusammengesetzt (Antwerpes, Wedig, & Wodarz, 2019).

Neben den schrittweisen Sequenzierungsplattformen, die Daten aus amplifizierten DNA-Bibliotheksfragmenten erzeugen, gibt es auch Plattformen, die einzelne DNA-Moleküle parallel sequenzieren (Mardis, 2017). Diese Einzelmolekülsequenzierungen

gehören den Sequenzierungen der dritten Generation an und benötigen keine vorangehende Polymerase-Kettenreaktion mehr (Pareek et al., 2011). Ein Nachteil der sogenannten Einzelmolekülsequenzierung ist die Schwierigkeit, ein ausreichendes Signal für den Nachweis der Sequenzierungsreaktion zu erzeugen. Dadurch weisen die Einzelmolekülsequenzierungen höhere Fehlerraten auf als Verfahren, die auf der Sequenzierung-durch-Synthese beruhen. Derzeit verfügbare Einzelmolekülsequenzierungs-Plattformen (Pacific Biosciences und Oxford Nanopore) produzieren wesentlich längere komplementäre Basensequenzen zum DNA-Fragment (Reads), als Sequenzierung-durch-Synthese-Plattformen. Damit wird der Zusammenbau von längeren komplementären DNA-Fragmenten zu langen zusammenhängenden Sequenzen selbst bei großen komplexen Genomen ermöglicht (Mardis, 2017).

Eine Einzelmolekülsequenzierungs-Plattform ist die Nanoporen-Sequenzierung. Hier werden Spannungsveränderungen beim Transport der DNA über eine Membran durch verschiedene künstliche Nanoporen gemessen. Ein elektrisches Signal von Nukleotiden wird beim Durchtritt einer Nanopore in Ionenstrom umgewandelt und der Durchmesser, die Länge und die Konformation des Moleküls werden sichtbar. Es handelt sich um eine α -Hämolysin-Pore, die kovalent mit einem Cyclodextrin Molekül verbunden ist. Der Ionenstrom wird blockiert, da Cyclodextrin eine Bindungsstelle für Nukleotide ist. Anhand der Zeitdauer, die für jede Base charakteristisch ist, kann die DNA-Sequenz bestimmt werden (Pareek et al., 2011).

Sobald die exakten Nukleinsäure-Sequenzen gewonnen wurden, ist es in der Regel erforderlich, die Sequenz mit einem Referenzgenom zu vergleichen (Long et al., 2018).

Durch die Integration von Ergebnissen aus verschiedenen NGS-Datensätzen können zell- oder gewebespezifische Veränderungen bei Krankheit oder Gesundheit interpretiert werden, beispielsweise die Genexpression. Genexpressionsprofile beschreiben, welche Gene gerade aktiv oder inaktiv sind anhand der Proteinsynthese aus der DNA. Die Erstellung dieser Profile erfolgt durch die Messung der mRNA-Konzentrationen in verschiedenen experimentellen Bedingungen (Haddad et al., 2017). Durch die RNA-Sequenzierung können sowohl Profile bekannter Gene erstellt

werden als auch neue Gene und Genvarianten entdeckt werden (Hung & Weng, 2017). Eine weitere interessante Anwendung von RNA-Sequenzierungsdaten menschlicher Tumoren ist die Charakterisierung von tumorinfiltrierenden Immunzellen (Finotello & Trajanoski, 2018).

Die massive parallele Sequenzierung führt eine rasant ansteigende Datenanhäufung herbei, wodurch die Datenverwaltung und die Integration mehrerer Plattformen von hoher Bedeutung sind (Hu et al., 2021). Die Dateninformationen können in DNA-Sequenzdatenbanken gespeichert werden und für wissenschaftliche Analysen mithilfe moderner Bioinformatik-Tools verwendet werden (Long et al., 2018). Eine der größten und bekanntesten Datenbanken ist der Krebsgenomatlas (TCGA; The Cancer Genome Atlas). Das Ziel dieser Datenbank ist es, die wichtigsten krebserregenden Genomveränderungen zu entdecken und zu katalogisieren, um einen umfassenden „Atlas“ der Krebsgenomprofile zu erstellen (Tomczak et al., 2015). TCGA-bezogene Ressourcen beinhalten derzeit Daten von über 30 menschlichen Tumorerkrankungen (Haddad, Zimmet, & Clarke, 2021).

2 Material und Methoden

In dieser Arbeit wurde eine Signatur von Genen analysiert, deren Expression kürzlich mit der erhöhten Freisetzung von Exosomen in Verbindung gebracht wurde (Fathi et al., 2021). Die Gene, die diese Signatur beinhaltet, können der **Tabelle 2** entnommen werden. Die Gensignatur wird in der gesamten Arbeit als „Fathi-EVsig“ bezeichnet. Grundlage dieser Analyse sind die Sequenzierungsdaten der Patientenkohorte in der Head and Neck Cancer-Datenbank des TCGA-Projekts. Diese Kohorte kann weiterhin in 98 HPV-positive und 422 HPV-negative Patienten aufgeteilt werden.

Es wurden die Wechselwirkungen zwischen den Proteinen der Fathi-EVsig betrachtet (Protein-Protein-Interaktion). Außerdem wurde die Genexpression der Fathi-EVsig im Tumor- und normalen soliden Gewebe verglichen sowie der Einfluss der Gensignatur auf die Überlebensprognose, die Immunlandschaft und die Mutationshäufigkeit von HNSCC-Patienten untersucht.

Die Ergebnisse wurden mit einer weiteren Gensignatur, die in dieser Arbeit als „Hurwitz-EVsig“ bezeichnet wurde, validiert (Hurwitz, Rider, et al., 2016). Die in der **Tabelle 2** gezeigte Hurwitz-EVsig basiert auf der proteomischen Charakterisierung von extrazellulären Vesikeln, die aus sechzig Zelllinien des National Cancer Institutes isoliert wurden (NCI-60). Die Autoren führten anschließend eine Korrelationsanalyse der Vesikelmenge und der Proteome durch, um Komponenten zu identifizieren, die mit der Produktion von extrazellulären Vesikeln zusammenhängen und erstellten auf der Grundlage ihrer Ergebnisse die aus 25 Genen bestehende Gensignatur (Hurwitz, Rider, et al., 2016).

Die Arbeit wurde in drei Teile gegliedert: Im ersten Abschnitt wurde die Gensignatur im Ganzen betrachtet, im zweiten Abschnitt wurde der unterschiedliche HPV-Infektionsstatus des Patienten in die Analyse miteingeschlossen und im dritten Abschnitt wurden Unterschiede in der Genexpression der einzelnen Gene der Signatur herausgearbeitet.

Tab. 2: Gensignaturen, die mit der Produktion von extrazellulären Vesikeln im Zusammenhang stehen ^a.

(Fathi et al., 2021)		(Hurwitz, Rider, et al., 2016)	
„Fathi-EVsig“		„Hurwitz-EVsig“	
<i>ARF6</i>	<i>RAB27B</i>	<i>ANXA2</i>	<i>SEC22B</i>
<i>ATG3</i>	<i>RAB35</i>	<i>ARF4</i>	<i>TAGLN2</i>
<i>ATG12</i>	<i>RALA</i>	<i>BSG</i>	<i>UBE2D3</i>
<i>BST2</i>	<i>RALB</i>	<i>CD59</i>	<i>VAMP3</i>
<i>CD9</i>	<i>SDC1</i>	<i>CD81</i>	
<i>CD63</i>	<i>SDC2</i>	<i>HLA-A</i>	
<i>CD82</i>	<i>SDC3</i>	<i>HRAS</i>	
<i>CHMP4C</i>	<i>SDC4</i>	<i>HSPA1B</i>	
<i>CIT</i>	<i>SDCBP</i>	<i>HSPB1</i>	
<i>CTTN</i>	<i>SMPD3</i>	<i>ITGB1</i>	
<i>DGKA</i>	<i>SNAP23</i>	<i>LGALS3BP</i>	
<i>HGS</i>	<i>STAM</i>	<i>MYL3</i>	
<i>PDCD6IP</i>	<i>STX1A</i>	<i>MYL6</i>	
<i>PKM2</i>	<i>SYT7</i>	<i>NME2</i>	
<i>PLD2</i>	<i>TSG101</i>	<i>NRAS</i>	
<i>RAB2B</i>	<i>TSPAN8</i>	<i>RAB5C</i>	
<i>RAB5A</i>	<i>VAMP7</i>	<i>RAB7A</i>	
<i>RAB7A</i>	<i>VPS4A</i>	<i>RAC1</i>	
<i>RAB9A</i>	<i>VTG1</i>	<i>RALB</i>	
<i>RAB11A</i>	<i>YKT6</i>	<i>RAP1B</i>	
<i>RAB27A</i>		<i>RHOA</i>	

^a Symbole der Gene, die in dieser Arbeit verwendet wurden.

2.1 Ziel dieser Arbeit

Es konnte bereits gezeigt werden, dass Exosomen mit ihren Bestandteilen Einflüsse auf die Tumor-Angiogenese, das Invasionsverhalten der Tumorzellen, die Unterdrückung der körpereigenen Immunantwort, sowie auf die Resistenz gegenüber Tumortheraeutika haben und so die Progression von HNSCCs stimulieren (Filipazzi et al., 2012; Z. Wang et al., 2016; Mashouri et al., 2019; Whiteside, 2021). Obwohl die funktionelle Bedeutung von Exosomen *in vitro* und in Tiermodellen somit eindrucksvoll herausgearbeitet werden konnte, bleibt die klinische Relevanz dieser Daten weiterhin unklar. Daher wurde in dieser Arbeit ein bioinformatischer Ansatz gewählt, um die Rolle von Exosomen bei der Gestaltung der zellulären Zusammensetzung der TMU

besser zu definieren. Eine Übersicht der analysierten Themen und der Gliederung dieser Arbeit befindet sich in der **Abbildung 1**.

Die Arbeit soll folgende Fragestellungen beantworten:

1. Wie unterscheidet sich die Expression der Gensignaturen im Stroma- und Tumorgewebe?
2. Wie korrelieren die Gensignaturen mit der Überlebenswahrscheinlichkeit?
3. Wie korrelieren die Gensignaturen mit der Immunzellinfiltration und gibt es Assoziationen mit immunmodulierenden Faktoren?
4. Welche Rolle spielen Mutationen im HNSCC?

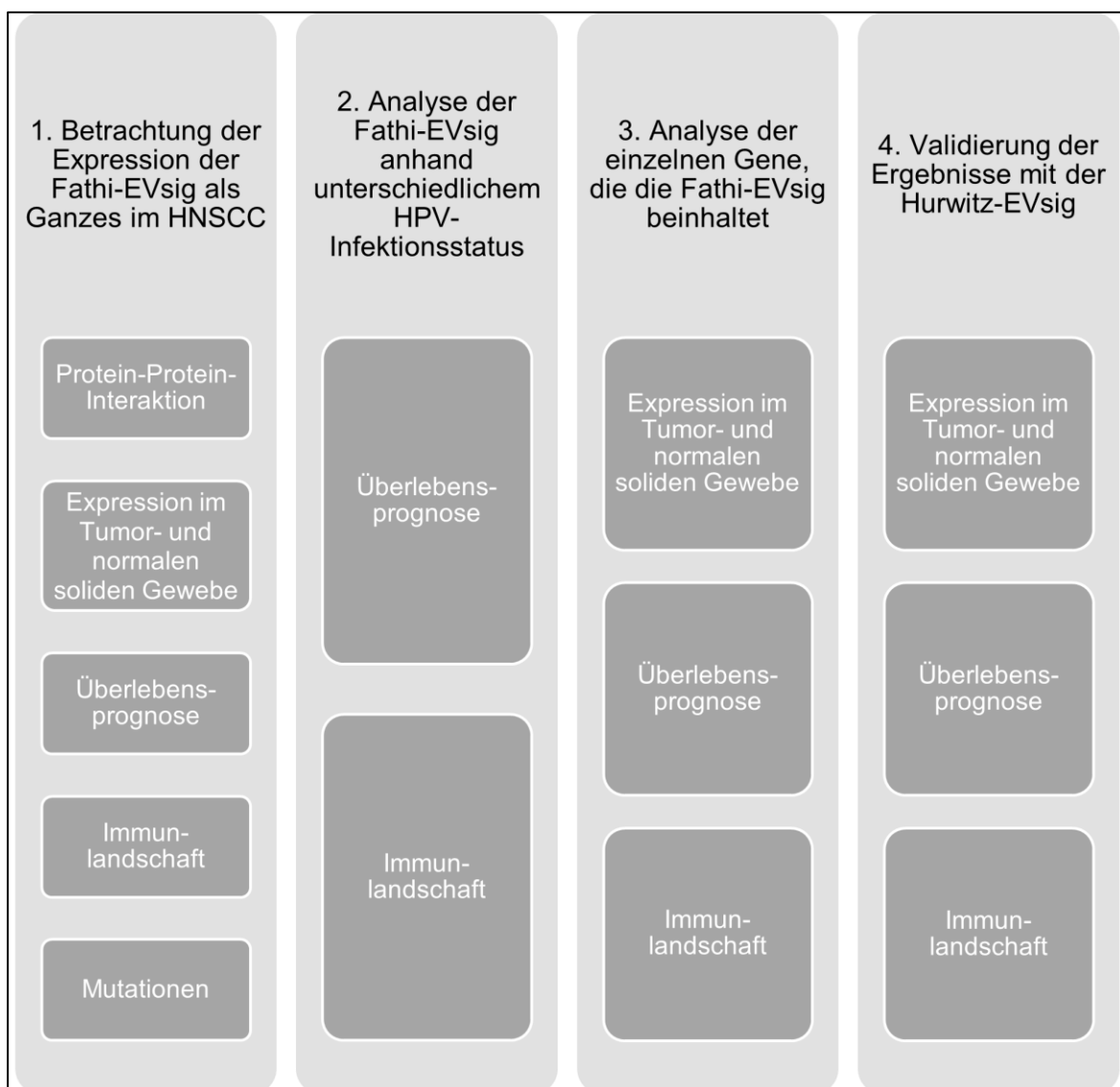


Abb. 1: Übersicht der analysierten Themen und der Gliederung dieser Arbeit.

2.2 Statistische Analyse

In diesem Abschnitt werden die bioinformatischen Tools und Programme erläutert, die zur Analyse verwendet wurden und zur Auswertung sowie zur Erstellung der Abbildungen in dieser Arbeit beitrugen. Außerdem werden statistische Größen, die in dieser Arbeit vorkommen, beschrieben.

Der p-Wert kommt mehrmals in dieser Arbeit vor. Er gibt die Wahrscheinlichkeit an, ob ein Ergebnis zufällig aufgetreten ist oder ein statistischer Zusammenhang besteht (Hung & Weng, 2017) und wurde mit einem festgelegten Grenzwert (Signifikanzniveau) von 5 % verglichen, um festzustellen, ob das Ergebnis statistisch signifikant ist. Ein p-Wert $< 0,05$ bedeutet, dass es einen statistischen Zusammenhang gibt, der nicht nur durch Zufall entstanden ist. In dieser Arbeit wurde die Stärke der Signifikanz in den Tabellen und Abbildungen mit Asterisken gekennzeichnet. Je kleiner der p-Wert ist, desto höher ist die Anzahl der Asterisken und desto wahrscheinlicher ist der statistische Zusammenhang.

In dieser Arbeit gilt: $p < 0,05^*$; $p < 0,01^{**}$; $p < 0,0001^{***}$; $p < 0,00001^{****}$.

2.2.1 Protein-Protein-Interaktionen

Die physikalischen und funktionellen Assoziationen und Wechselwirkungen zwischen den Proteinen der Fathi-EVsig wurden in der Datenbank Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins (STRING, Version 11.5; <https://string-db.org/>, verwendet am 13.10.2021) analysiert und in der **Abbildung 2** grafisch dargestellt (Szklarczyk et al., 2021).

GeneMANIA (<https://genemania.org/>, verwendet am 13.10.2021) konnte verwandte Proteine anhand von Signalwegen, Koexpressionen und Ähnlichkeiten der Proteindomänen finden, indem die Fathi-EVsig als Abfrage verwendet wurde (siehe **Abbildung 3**) (Warde-Farley et al., 2010).

2.2.2 Vergleich der Genexpression im Tumor- und normalen soliden Gewebe

Um zu ermitteln, ob die Gene der Fathi-EVsig vermehrt im Tumor- oder im normalen soliden Gewebe exprimiert werden, wurde das Bioinformatik-Tool Gene Expression Profiling Interactive Analysis 2 (GEPIA2; <http://gepia2.cancer-pku.cn/>, Tang et al., 2019) am 21.12.2022 verwendet. In der **Abbildung 4** wurden 519 HNSCC-Proben mit 44 normalen Kontrollproben verglichen.

Außerdem wurden die Expressionsprofile der einzelnen Gene auf der Grundlage von RNA-Sequenzierungsdaten in insgesamt 564 HNSCC-Proben mit 44 normalen Kontrollproben unter Verwendung des Xena-Browsers der Universität von Kalifornien, Santa Cruz (UCSC; <https://xenabrowser.net/>, verwendet am 05.09.2021), verglichen (Goldman et al., 2020). Das Tool berechnete die Medianwerte der Genexpression sowohl im HNSCC-Gewebe als auch im normalen soliden Gewebe. Für die Auswertung wurden die Mittelwerte berechnet. Ein Mittelwert, der größer als eins war, bedeutete, dass das Gen im Tumorgewebe hochreguliert war und ein Mittelwert, der kleiner als eins war, bedeutete, dass das Gen im gesunden Gewebe hochreguliert war. Die Visualisierung dieser Daten in der **Abbildung 14** erfolgte durch eine Heatmap, die mit Excel Version 2308, erstellt wurde.

2.2.3 Einfluss der Signatur auf die Überlebensprognose der Patienten

Um den Einfluss der Fathi-EVsig auf das Überleben der HNSCC-Patienten zu analysieren, wurde das Bioinformatik-Tool GEPIA2 am 18.03.2022 verwendet. Für die Generierung der Heatmap, die in der **Abbildung 15** zu sehen ist und auf der jedes Gen einzeln angeführt ist, wurde die Fathi-EVsig in GEPIA2 eingegeben, die Überlebenszeiteinheit in Monaten und das mediane Gesamtüberleben (OS) ausgewählt.

Das Gesamtüberleben beschreibt die gesamte Zeitspanne beginnend mit dem Einschluss des Patienten in eine Studie bis zum Tod des Patienten, unabhängig von

der Todesursache. Es schließt das progressionsfreie Überleben, also die Zeit vom Behandlungsbeginn bis zum weiteren Fortschreiten der Erkrankung wie Rezidiven, Metastasenbildung oder sogar dem Tod, und die Zeit ab einem Fortschreiten der Erkrankung bis zum Tod mit ein (Antwerpes, Wedig, & Kuklinski, 2019).

Die Ergebnisse wurden in Hazard Ratio (HR) als Logarithmus zur Basis 10 für jedes einzelne Gen der Fathi-EVsig angegeben. Das Hazard beschreibt die Wahrscheinlichkeit, dass der Tod des Patienten innerhalb eines definierten Zeitraumes eintritt und das Hazard Ratio ist der Quotient aus den Hazards von zwei Gruppen (Zwiener et al., 2011). Es verglich in dieser Arbeit die Überlebenszeiten zwischen Patientenproben mit hoher Genexpression und niedriger Genexpression. $\text{Log}_{10}(\text{HR}) = 0$ oder $\text{HR} = 1$ bedeutete, dass es eine hohe Genexpression weder ein höheres noch ein niedrigeres Sterberisiko darstellte. $\text{Log}_{10}(\text{HR}) > 0$ oder $\text{HR} > 1$ bedeutete, dass die beobachtete Krebs-Patientengruppe innerhalb eines bestimmten Zeitraumes ein größeres Sterberisiko bei gleichzeitiger Zunahme der Genexpression hatte. $\text{Log}_{10}(\text{HR}) < 0$ oder $\text{HR} < 1$ bedeutete, dass das Sterberisiko für die beobachtete Krebs-Patientengruppe bei gleichzeitigem Anstieg der Genexpression kleiner war.

Überlebensraten geben an, bei wie vielen Patienten bis zu einem bestimmten Zeitpunkt noch kein Ereignis eingetreten ist (Zwiener et al., 2011). Sie wurden in dieser Arbeit als Kaplan-Meier-Kurven in der **Abbildung 5** durch das Tool GEPIA2 (verwendet am 18.03.2022) dargestellt. Die Kaplan-Meier-Kurven in den **Abbildungen 16** und **17** wurden aus der Datenbank des Tools TIMER2.0 (<http://timer.cistrome.org/>, verwendet am 05.02.2022) (T. Li et al., 2020) erstellt. Dafür wurde das Modul „Gene_Outcome“ verwendet, die zu analysierenden Gene der Fathi-EVsig eingegeben und die 5-Jahres-Überlebensrate betrachtet.

Allen Kaplan-Meier-Kurven ist gemeinsam, dass sich auf der senkrechten y-Achse der Prozentsatz der Patienten befindet, die noch unter dem Risiko zu sterben stehen, und auf der waagerechten x-Achse die Überlebenszeit in Monaten eingetragen ist. Der Log-Rang-Test (engl. log-rank-test) vergleicht die Überlebenszeiten bei hoher und bei niedriger Genexpression miteinander. Dabei wird der gesamte Beobachtungszeitraum

betrachtet und kein definierter Zeitraum, wie bei der Überlebensrate (Zwiener et al., 2011).

Beim Vergleich der Überlebensprognosen bei unterschiedlichem HPV-Infektionsstatus von HNSCC-Patienten aus der **Abbildung 11** lieferte das Tool TIMER2.0 die Z-Werte und die HR-Werte. Ein Z-Wert von eins bedeutet in dieser Arbeit, dass dieser Wert eine Standardabweichung oberhalb des Mittelwerts liegt. Ein Z-Wert von minus zwei bedeutet, dass dieser Wert zwei Standardabweichungen unterhalb des Mittelwertes liegt.

2.2.4 Einfluss der Signatur auf die Immunlandschaft

Tumor Immune Estimation Resource (TIMER; <https://cistrome.shinyapps.io/timer/>, verwendet am 08.09.2021), ein Webserver für die umfassende Analyse von tumorinfiltrierenden Immunzellen, wurde verwendet, um den potenziellen Zusammenhang zwischen den Kandidatengenen der Fathi-EVsig und der Immunzellinfiltration zu ermitteln (Lawrence et al., 2015). In dieser Arbeit wurde das Gen-Modul verwendet und jedes einzelne Gen der Fathi-EVsig wurde eingegeben, um dessen Genexpression mit der Immunzellinfiltration im HNSCC zu korrelieren und zu visualisieren. Zu den untersuchten Immunzellen zählten B-Zellen, CD8(+) T-Zellen, CD4(+) T-Zellen, Makrophagen, Neutrophile und DCs.

Das Bioinformatik-Tool TIMER erstellte Streudiagramme, die in der **Abbildung 18** zu sehen sind. Sie zeigen die reinheitskorrigierten partiellen Korrelationswerte. Zur Berechnung der durchschnittlichen Korrelationen wurden die partiellen Korrelationswerte vorher in Fishers Z-Werte transformiert, um die Korrelationen in annähernd intervallskalierte Werte zu überführen. Daraus wurde eine Heatmap, die in der **Abbildung 6** zu erkennen ist, mit GraphPad Prism Version 9.4.0 erstellt.

Das Tool TIMER2.0 wurde am 08.09.2021 und am 01.11.2021 verwendet, um die Korrelation von Tregs, MDSCs, Endothelzellen, CAFs in der **Abbildung 12** und M0-, M1- und M2-Makrophagen in den **Abbildungen 8** und **13** mit den Kandidatengenen

zu untersuchen. Die Zusammenhänge wurden durch den Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman (Spearman's Rho) überprüft. Spearman's Rho kann Werte zwischen plus eins und minus eins annehmen. Ein positiver Zusammenhang lag vor, wenn der Wert größer als Null war, ein Wert kleiner als Null beschrieb eine negative Korrelation und eine Korrelation von Null bedeutete, dass es keinen Zusammenhang gab (T. Li et al., 2020). Die Streudiagramme der Gene *RAB27a* und *SDC3*, die das Tool TIMER2.0 erstellte, wurden in der **Abbildung 19** dargestellt.

Zusätzlich wurde die Korrelation der Fathi-EVsig mit der Immunzellinfiltration mithilfe des Bioinformatik-Tools GEPIA2 (verwendet am 20.03.2022) anhand ausgewählter Immunzellmarker überprüft. In dieser Arbeit wurden die Marker *CD19*, *CD79A*, *CD79B* und *MS4A1* für B-Zellen, *CD8* für CD8(+) T-Zellen, *CD4* für CD4(+) T-Zellen, *CD69* für Makrophagen, *FCGR3B*, *CEACAM3*, *CXCR1* und *CXCR2* für Neutrophile, *CD1A*, *CD1B*, *CD1E* und *CLEC10A* für DCs, *FOXP3* für Tregs, *DCN*, *TAGLN*, *COL1A1* und *COL6A2* für CAFs, *VWF*, *CDH5*, *MMRN1* und *MMRN2* für Endothelzellen und *CD11B*, *CD14*, *CD33*, *CD66B* für myeloische Suppressorzellen verwendet. Die Fathi-EVsig und die vorher genannten Immunzellmarker wurden im Modul „Correlation Analysis“ eingegeben und die Kohorte „HNSC Tumor“ wurde ausgewählt. Daraufhin lieferte das Tool den p-Wert und den Pearson-Korrelationskoeffizienten für jeden Immunzelltyp von Interesse. Die Pearson-Korrelationswerte in der **Abbildung 7** wurden durch Excel, Version 2308, als Heatmap grafisch dargestellt. Die Pearson-Korrelation bestimmt den linearen Zusammenhang zweier Variablen und kann wie die Spearman-Korrelation Werte zwischen plus eins und minus eins annehmen.

Die Datenbank für Tumor-Immunsystem-Interaktionen und Arzneimittel (TISIDB; <http://cis.hku.hk/TISIDB/>) wurde am 17.12.2021 verwendet, um den möglichen Zusammenhang zwischen den Kandidatengenen und Immunmodulatoren, Chemokinen, Rezeptoren und MHC-Molekülen bei HNSCC-Patienten zu ermitteln (Ru et al., 2019). Jedes Gen der Fathi-EVsig wurde einzeln unter „Quick Search“ eingegeben und mit vorgefertigten Gen-Markern von Immunmodulatoren, Chemokinen, Rezeptoren und MHC-Molekülen korreliert. Das Tool lieferte Spearman-Korrelationswerte für jeden Gen-Marker. Anschließend wurden die Spearman-Korrelationswerte in Fishers Z-Werte transformiert, um die Korrelationen in annähernd intervallskalierte Werte zu überführen. Daraus wurde für jeden Gen-Marker der

Mittelwert berechnet und Werte wurden als Wasserfalldiagramme in der **Abbildung 9** grafisch dargestellt.

2.2.5 Einfluss von Mutationen im Tumorgewebe

Das Mutationsmodul von TIMER2.0 wurde am 20.10.2022 verwendet, um die Mutationshäufigkeit bei einer hohen Genexpression der Fathi-EVsig herauszuarbeiten (T. Li et al., 2020). Die TCGA-Kohorte umfasste 509 Proben für HNSCCs, davon 408 Proben für HPV-negative und 92 Proben für HPV-positive Tumoren. Die Ergebnisse wurden in einem mit Word erstellten Balkendiagramm in der **Abbildung 10** grafisch dargestellt. Dabei wurden auf der waagerechten x-Achse die Gene der Fathi-EVsig eingetragen und auf der senkrechten y-Achse wurde die Anzahl der mutierten Proben notiert.

2.2.6 Validierung der Ergebnisse

Zur Validierung der bedeutsamsten Ergebnisse wurde die von Hurwitz et al. (Hurwitz, Rider, et al., 2016) veröffentlichte Gensignatur verwendet. Sie beinhaltet 25 Gene, die mit der Produktion von extrazellulären Vesikeln in Verbindung stehen.

Die Signaturen von Fathi et al. und Hurwitz et al. wiesen größtenteils unterschiedliche Gene auf. *RAB7A* und *RALB* waren die einzigen Gene, die in beiden Gensignaturen enthalten waren.

Der Expressionsvergleich der Hurwitz-EVsig im Tumor und im gesunden Gewebe erfolgte wie im Kapitel 2.2.2 mithilfe des Bioinformatik-Tools GEPIA2 am 21.12.2022. In der **Abbildung 20** wurden 519 HNSCC-Proben mit 44 normalen Kontrollproben verglichen und es wurde ein Box-Plot erstellt. Außerdem wurden die Expressionsprofile der einzelnen Gene auf der Grundlage von RNA-Sequenzierungsdaten in insgesamt 564 HNSCC-Proben mit 44 normalen Kontrollproben unter Verwendung des UCSC Xena-Browsers am 20.03.2022

durchgeführt und mithilfe Excel, Version 2308, grafisch dargestellt (siehe **Abbildung 21**).

Die Analyse der Immunzellinfiltration in der **Abbildung 25** anhand der im Kapitel 2.2.4 beschriebenen Immunzellmarker und die Anfertigung der Heatmap in der **Abbildung 22** sowie die Erstellung der Kaplan-Meier-Kurven in der **Abbildung 24** erfolgte wie im Kapitel 2.2.3 mit dem Tool GEPIA2 am 20.10.2022.

Zusätzlich wurden die statistisch signifikanten Gene aus der Heatmap, die maßgeblich an der Überlebensprognose beteiligt waren, wie im Kapitel 2.2.3 mithilfe des Bioinformatik-Tools TIMER2.0 am 20.10.2022 weiter analysiert und in der **Abbildung 23** dargestellt.

3 Ergebnisse

Der Ergebnisteil wurde in vier Abschnitte gegliedert. Im Kapitel 3.1 wurde die Signatur im Ganzen analysiert und ausgewertet. Der unterschiedliche HPV-Infektionsstatus der Patienten wurde im Kapitel 3.2 berücksichtigt und im Kapitel 3.3 wurden die Analyseergebnisse bei Betrachtung jedes einzelnen Gens der Signatur dargelegt. Eine Validierung der Ergebnisse mit der Hurwitz-EVsig erfolgte im Kapitel 3.4.

3.1 Betrachtung der Fathi-EVsig als Ganzes

In diesem Abschnitt wurden die Protein-Protein-Interaktionen der Gensignatur betrachtet. Um herauszufinden, welchen Beitrag Exosomen generell beim HNSCC leisten, wurde die Genexpression der Fathi-EVsig im Tumor- und normalen soliden Gewebe untersucht und verglichen. Außerdem wurde der Zusammenhang der Fathi-EVsig mit der Überlebensprognose und der Immunzellinfiltration untersucht.

3.1.1 Protein-Protein-Interaktionen

In der **Abbildung 2** erkennt man, dass die Gensignatur in sich in einem funktionellen Zusammenhang steht. Die Gene übernehmen bei der Biogenese der Exosomen verschiedene Funktionen. Sie können beim Andocken und der Fusion von Transportvesikeln interagieren, den Vesikelverkehr und den Proteintransport steuern, die Transportprozesse sowie die intrazelluläre Signaltransduktion regulieren, das Zytoskelett umbauen, MVBs sortieren sowie die Apoptose und den Wachstumsstillstand von Zellen einleiten.

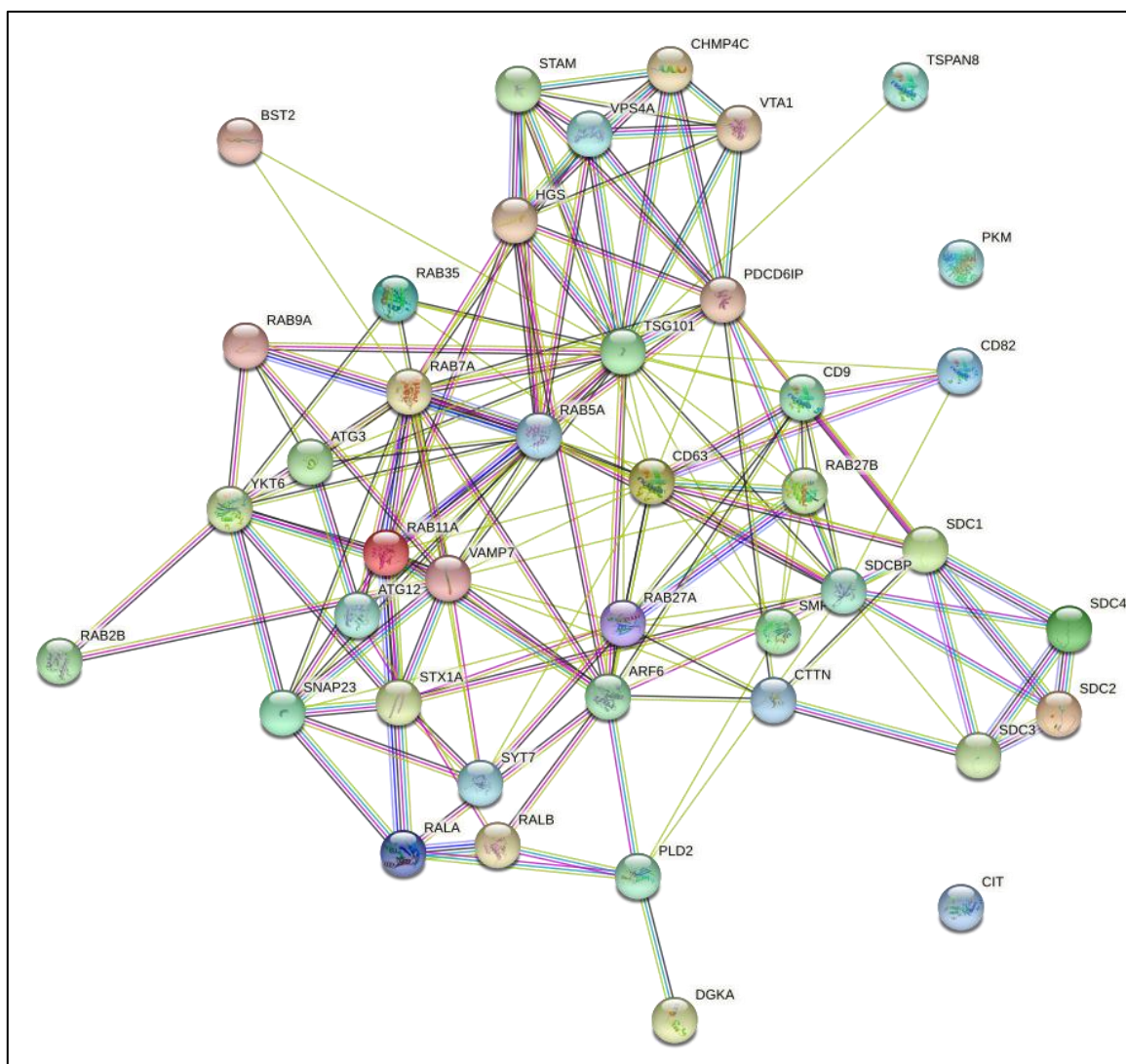


Abb. 2: Physikalische und funktionelle Interaktionen der Fathi-EVsig.

Da beim Auftreten und der Entwicklung vom HNSCC mehrere Transkriptionsfaktoren und Protein-Koexpressionen eine wesentliche Rolle beim Regulierungsnetzwerk spielen, wurden in der Datenbank GeneMANIA verwandte Daten gesucht. Als verwandte Transkriptionsfaktoren wurden die Proteine CTNND1, PLEKHM2, TIAM1, RALBP1, RAB11FIP3, SNAP25, VAMP2, RNH1, ATG5, SEC22B, PKLR, MLPH, BROX, MRPS30, RNF130, CHMP4A, ZFYVE27, ZFYVE19 und CHMP4B identifiziert und in der **Abbildung 3** dargestellt.

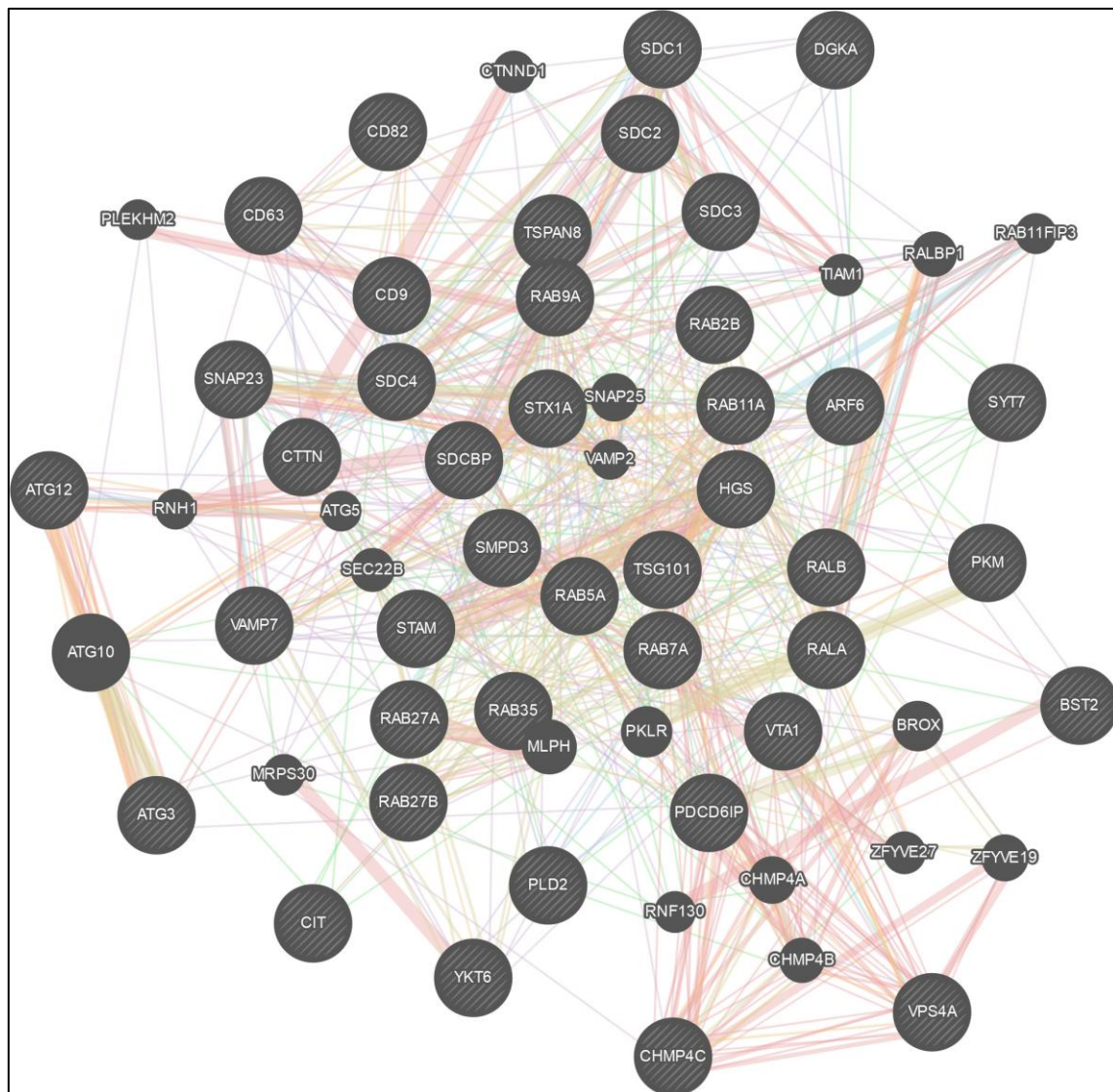


Abb. 3: Analyse der Protein-Koexpressionen im Zusammenhang mit der Fathi-EVsig.

3.1.2 Vergleich der Genexpression der Signatur im Tumor- und normalen soliden Gewebe

Die **Abbildung 4** zeigt, dass das Expressionsniveau der Gensignatur, die mit der Produktion von extrazellulären Vesikeln im Zusammenhang steht, im Tumorgewebe erhöht war, obwohl es keine statistisch signifikanten Unterschiede erreichte.

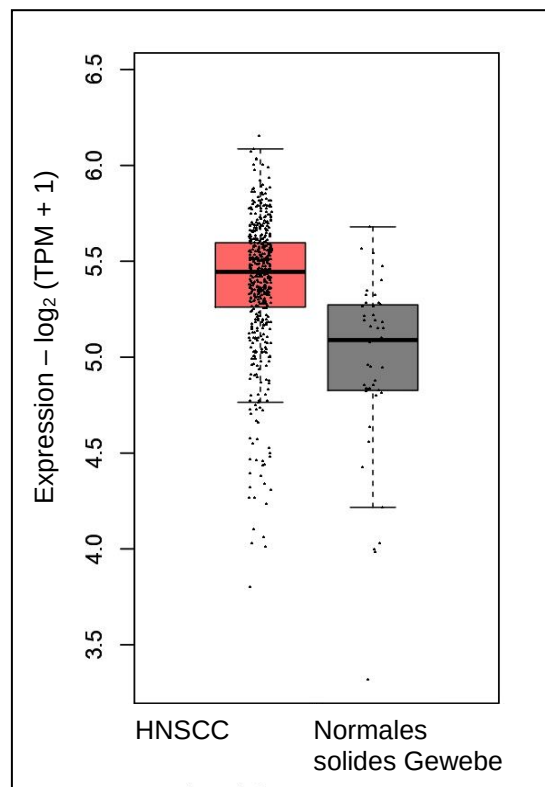


Abb. 4: Vergleich der Fathi-EVsig-Genexpression im normalen soliden Gewebe (n = 44) und im primären HNSCC (n = 519). Der hier dargestellte Box-Plot zeigt eine erhöhte Genexpression der Fathi-EVsig im Tumorgewebe. Die Daten wurden im Publikationsorgan *Clinical and Experimental Immunology* veröffentlicht.

3.1.3 Einfluss der Signatur auf die Überlebensprognose der Patienten

Das Kaplan-Meier-Diagramm in der **Abbildung 5 (A)** zeigt, dass für die Fathi-EVsig kein signifikanter Einfluss auf das Gesamtüberleben nachweisbar war ($p > 0,05$). Es gab jedoch einen Trend, dass erhöhte Expressionsniveaus mit einem schlechten

progressionsfreien Überleben assoziiert waren. Das zugehörige Kaplan-Meier-Diagramm befindet sich in der **Abbildung 5 (B)**.

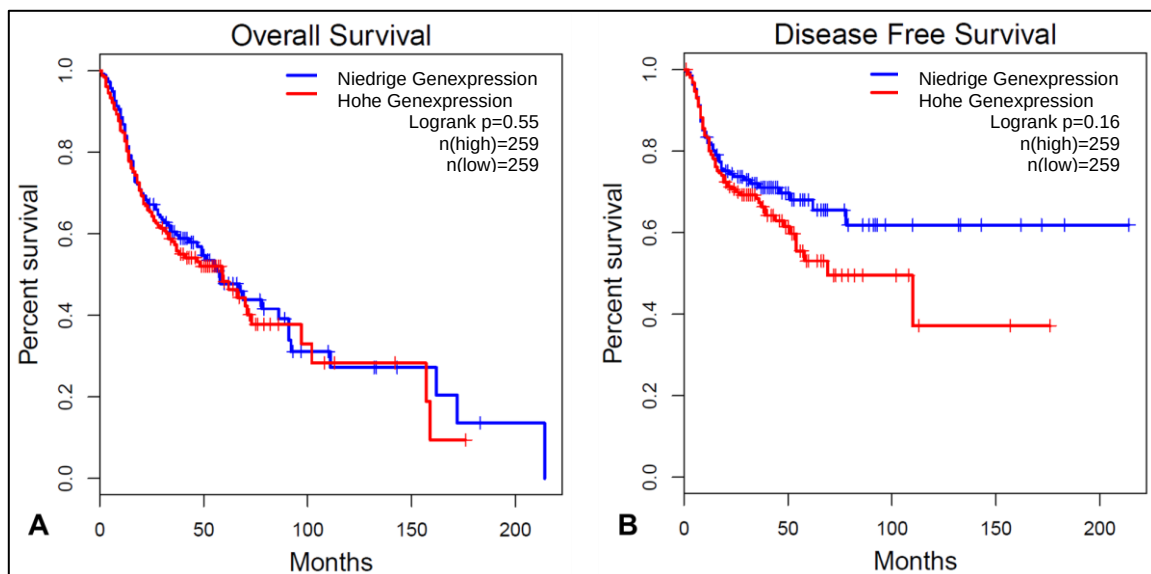


Abb. 5: Analyse der Genexpression der Fathi-EVsig bei HNSCC-Patienten und dessen Auswirkungen auf das Überleben der Patienten. **(A)** Kaplan-Meier-Gesamtüberlebenskurve der Fathi-EVsig bei hoher Genexpression (rote Linie) im Vergleich zu niedriger Genexpression (blaue Linie). Auf das Gesamtüberleben war kein signifikanter Einfluss nachweisbar. **(B)** Kaplan-Meier-Kurve für das progressionsfreie Überleben von Patienten bei hoher Genexpression (rote Linie) der Fathi-EVsig im Vergleich zu niedriger Genexpression (blaue Linie). Eine hohe Genexpression der Fathi-EVsig war mit einem schlechteren progressionsfreien Überleben verbunden. Die Daten wurden im Publikationsorgan *Clinical and Experimental Immunology* veröffentlicht.

3.1.4 Einfluss der Signatur auf die Immunlandschaft

Die Korrelation der Gene, die mit der Produktion von extrazellulären Vesikeln im Zusammenhang stehen, mit den B-Zellen, CD8(+) T-Zellen, CD4(+) T-Zellen, Makrophagen, Neutrophilen und DCs wurde in der **Abbildung 6** durch eine Heatmap dargestellt. Die Korrelationsanalyse mit dem Tool TIMER zeigte, dass eine hohe Genexpression der Fathi-EVsig mit einer erhöhten Anzahl von tumorinfiltrierenden CD4(+) T-Zellen, Makrophagen, neutrophilen Granulozyten und DCs im

Tumorgewebe korrelierte ($p < 0,01$). Interessanterweise stellte sich heraus, dass eine hohe Expression der Fathi-EVsig auch mit einem Ausschluss von B-Zellen und CD8(+) T-Zellen im Tumorgewebe verbunden war ($p < 0,01$). Eine Übersicht der signifikanten p-Werte befindet sich in der **Tabelle 3**.



Abb. 6: Korrelation der Fathi-EVsig mit der Immunzellinfiltration bei HNSCC-Patienten. Die grünen Blöcke der hier dargestellten Heatmap kennzeichnen eine negative Korrelation und die roten Blöcke eine positive Korrelation. Die Gensignatur war mit einer erhöhten Infiltrationshäufigkeit von CD4(+) T-Zellen, Makrophagen, Neutrophilen und DCs verbunden, wohingegen B-Zellen und CD8(+) T-Zellen bei der Zunahme der Genexpression ausgeschlossen wurden.

Tab. 3: Korrelation der Fathi-EVsig mit B-Zellen, CD8(+) T-Zellen, CD4(+) T-Zellen, Makrophagen, Neutrophilen und DCs mit TIMER aus der **Abbildung 6**.

****p < 0.0001; ***p < 0.001; **p < 0.01; *p < 0.05; ns p > 0.05;

* = positive Partialkorrelation, * = negative Partialkorrelation

Gene	Purity	B-Zellen	CD8(+) T-Zellen	CD4(+) T-Zellen	Makrophagen	Neutrophile	DCs
<i>HGS</i>	*	*	****	***	ns	ns	ns
<i>STAM</i>	ns	ns	ns	*	ns	ns	ns
<i>TSG101</i>	ns	ns	ns	***	ns	****	***
<i>CHMP4C</i>	ns	ns	ns	ns	*	ns	ns
<i>PDCD6IP</i>	**	ns	ns	****	ns	****	****
<i>VTA1</i>	**	ns	*	****	ns	*	ns
<i>VPS4A</i>	**	ns	ns	***	**	ns	ns
<i>SDCBP</i>	ns	ns	ns	****	****	****	****
<i>SDC1</i>	ns	**	****	*	****	****	****
<i>SDC2</i>	ns	***	ns	****	****	**	****
<i>SDC3</i>	***	****	***	****	****	****	****
<i>SDC4</i>	ns	*	***	ns	**	**	ns
<i>CD9</i>	****	*	ns	ns	ns	***	ns
<i>CD82</i>	**	ns	ns	****	ns	****	****
<i>CD63</i>	ns	****	****	****	****	****	****
<i>TSPAN8</i>	ns	****	****	****	**	ns	**
<i>SYT7</i>	*	***	****	ns	ns	ns	ns
<i>VAMP7</i>	ns	**	ns	****	****	****	****
<i>YKT6</i>	ns	**	****	ns	ns	*	*
<i>STX1A</i>	ns	*	**	ns	ns	ns	ns
<i>PKM2</i>	ns	****	**	ns	ns	***	ns
<i>SNAP23</i>	ns	**	ns	****	****	***	****
<i>RALA</i>	ns	ns	ns	**	ns	*	**
<i>RALB</i>	ns	***	**	*	ns	ns	ns

<i>RAB2B</i>	ns	**	ns	****	***	**	****
<i>RAB5A</i>	ns	****	****	****	**	***	****
<i>RAB9A</i>	ns	*	*	ns	ns	***	**
<i>RAB7A</i>	ns	ns	***	ns	ns	ns	ns
<i>RAB11A</i>	ns	ns	ns	ns	****	ns	**
<i>RAB27A</i>	****	****	****	****	****	****	****
<i>RAB27B</i>	*	ns	*	****	ns	****	****
<i>RAB35</i>	ns	ns	***	****	****	****	****
<i>CIT</i>	****	***	**	****	****	****	****
<i>CTTN</i>	ns	***	**	ns	ns	ns	ns
<i>SMPD3</i>	****	****	ns	****	ns	ns	*
<i>DGKA</i>	ns	*	**	**	**	ns	ns
<i>PLD2</i>	**	ns	*	ns	****	ns	ns
<i>ARF6</i>	ns	ns	ns	***	*	**	ns
<i>BST2</i>	****	ns	**	**	ns	****	****
<i>ATG12</i>	ns	ns	ns	****	****	****	****
<i>ATG3</i>	**	**	ns	****	**	**	**

Die Analyse der Immunzellinfiltration mit dem Tool GEPIA2 ist in der **Abbildung 7** dargestellt und ergab ebenfalls, dass B-Zellen und CD8(+) T-Zellen ausgeschlossen werden, während CD4(+) T-Zellen, Makrophagen, Neutrophile und DCs vermehrt ins Tumorgewebe infiltrieren. Diese Beobachtung bestätigte, dass das Immunprofil mit einer Unterdrückung der B-Zellen und CD8(+) T-Zellen sowie einer vermehrten Infiltration von potenziell malignen Zellen einhergeht und durch eine erhöhte Ausschüttung von Exosomen gekennzeichnet ist.

Da diese Gensignatur offenbar die Immunzelllandschaft im HNSCC formt, wurde der Zusammenhang zwischen der Fathi-EVsig und den molekularen Markern von Immunzell-Subtypen weiter untersucht und tumorinfiltrierende Tregs, MDSCs, Endothelzellen sowie CAFs in die Analyse miteingeschlossen. Das Ergebnis in der **Abbildung 7** zeigt eine erhöhte Infiltrationshäufigkeit der zusätzlich untersuchten Immunzellen. Zudem war die Infiltration von CAFs und Endothelzellen im Tumorgewebe stärker ausgeprägt als im normalen soliden Gewebe.

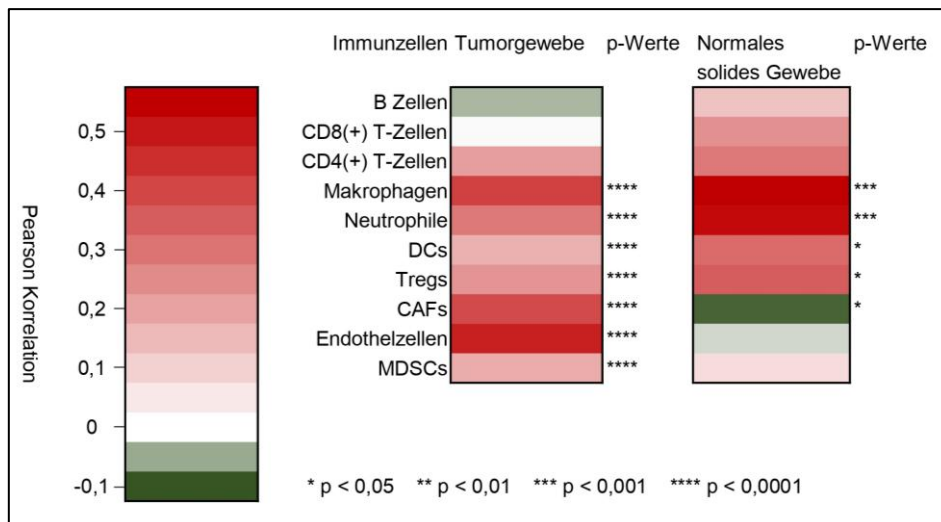


Abb. 7: Ergebnis der Korrelationsanalyse der Immunzellinfiltration mit der Fathi-EVsig im Tumorgewebe und im normalen soliden Gewebe als Heatmap. Die Zunahme der Genexpression der Fathi-EVsig war mit einer erhöhten Infiltrationshäufigkeit von Tregs, MDSCs, Endothelzellen und CAFs und mit einem Ausschluss von B-Zellen und CD8(+) T-Zellen verbunden.

In Anbetracht dieser Ergebnisse wurde die Immunzellinfiltration in dieser Arbeit genauer charakterisiert und die Makrophagen wurden in M1- und M2-Makrophagen unterteilt. Da kontrovers diskutiert wird, ob die Exosomen im HNSCC die Makrophagen in Richtung M1 oder M2 polarisieren, wurde die Fathi-EVsig mit Makrophagen-Markern korreliert und die Spearman-Korrelationswerte der M0-, M1- und M2-Makrophagen wurden mithilfe des Tools TIMER2.0 ermittelt. Die Ergebnisse wurden als Heatmap in der **Abbildung 8** dargestellt und zeigten, dass Exosomen die Infiltration mit naiven M0-Makrophagen im HNSCC stimulieren und in den Tumor infiltrieren. Eine Übersicht der signifikanten Werte ist in der **Tabelle 4** gegeben. Den Ergebnissen zufolge findet weniger eine Polarisierung statt, sondern es kommt eher zu einer funktionellen Änderung als zu einer phänotypischen Änderung der Zellen.

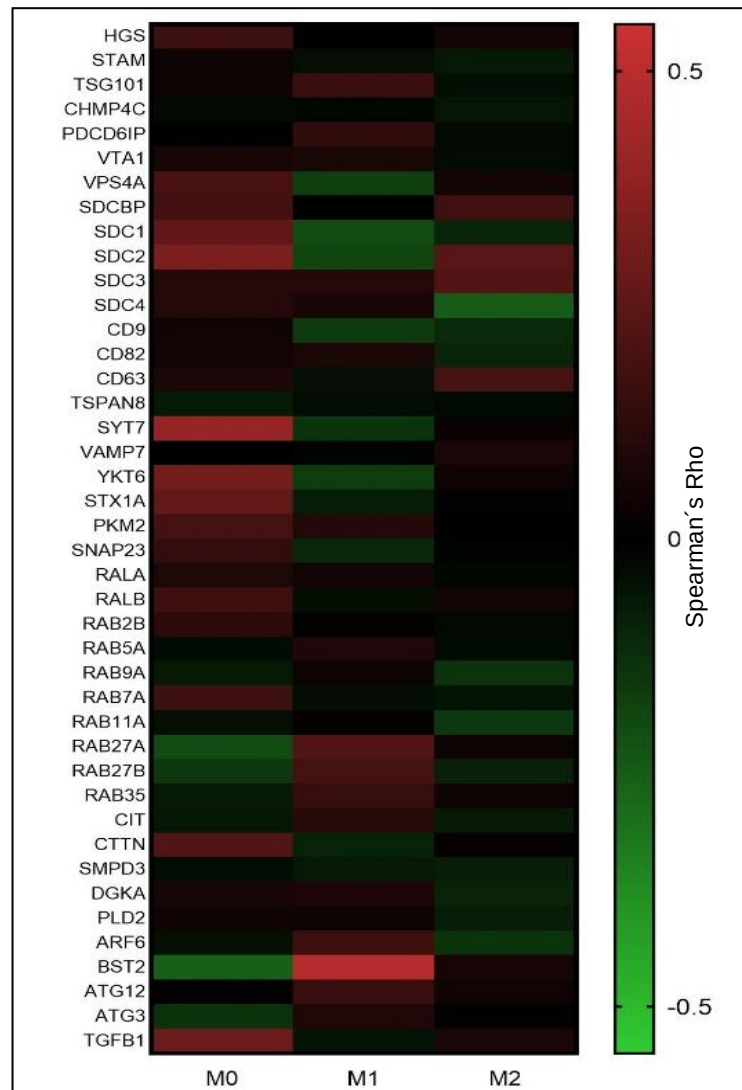


Abb. 8: Darstellung der Korrelationsanalyse der Fathi-EVsig mit M0-, M1- und M2-Makrophagen als Heatmap. Die grünen Blöcke kennzeichnen eine negative Korrelation und die roten Blöcke eine positive Korrelation. Die Gensignatur war mit einer erhöhten Infiltration von naiven M0-Makrophagen verbunden. Die Daten wurden im Publikationsorgan *Journal of Extracellular Vesicles* veröffentlicht.

Tab. 4: Korrelation der Fathi-EVsig mit Makrophagen-Markern mit TIMER2.0 aus der **Abbildung 8**.

****p < 0.0001; ***p < 0.001; **p < 0.01; *p < 0.05; ns p > 0.05;

* = positive Spearman-Korrelation, * = negative Spearman-Korrelation

Gene	M0	M1	M2	Gene	M0	M1	M2
<i>HGS</i>	***	ns	ns	<i>SNAP23</i>	**	*	ns
<i>STAM</i>	ns	ns	ns	<i>RALA</i>	ns	ns	ns
<i>TSG101</i>	ns	***	ns	<i>RALB</i>	***	ns	ns
<i>CHMP4C</i>	ns	ns	ns	<i>RAB2B</i>	**	ns	ns
<i>PDCD6IP</i>	ns	**	ns	<i>RAB5A</i>	ns	ns	ns
<i>VTA1</i>	ns	ns	ns	<i>RAB9A</i>	ns	ns	**
<i>VPS4A</i>	****	***	ns	<i>RAB7A</i>	***	ns	ns
<i>SDCBP</i>	****	ns	***	<i>RAB11A</i>	ns	ns	***
<i>SDC1</i>	****	****	*	<i>RAB27A</i>	****	****	ns
<i>SDC2</i>	****	****	****	<i>RAB27B</i>	***	****	ns
<i>SDC3</i>	ns	ns	****	<i>RAB35</i>	ns	**	ns
<i>SDC4</i>	ns	ns	****	<i>CIT</i>	ns	*	ns
<i>CD9</i>	ns	***	*	<i>CTTN</i>	****	ns	ns
<i>CD82</i>	ns	ns	ns	<i>SMPD3</i>	ns	ns	ns
<i>CD63</i>	ns	ns	****	<i>DGKA</i>	ns	ns	ns
<i>TSPAN8</i>	ns	ns	ns	<i>PLD2</i>	ns	ns	ns
<i>SYT7</i>	****	**	ns	<i>ARF6</i>	ns	***	**
<i>VAMP7</i>	ns	ns	ns	<i>BST2</i>	****	****	ns
<i>YKT6</i>	****	***	ns	<i>ATG12</i>	ns	***	ns
<i>STX1A</i>	****	ns	ns	<i>ATG3</i>	**	ns	ns
<i>PKM2</i>	****	ns	ns	<i>TGFB1</i>	****	ns	ns

Um die Auswirkungen der Gene, die mit der Produktion von extrazellulären Vesikeln im Zusammenhang stehen, auf den Immunphänotyp von HNSCC-Patienten zu bewerten, wurde die Genexpression der Fathi-EVsig mit den Expressionsniveaus von Genen korreliert, die bekanntermaßen eine immunsuppressive oder immunstimulierende Rolle spielen. Zudem wurde der Zusammenhang der Gensignatur mit Chemokinen, Rezeptoren und MHC-Molekülen überprüft. Die Ergebnisse wurden als Wasserfall-Diagramme in der **Abbildung 9** dargestellt.

Die Fathi-EVsig korrelierte negativ mit den meisten immunsuppressiven Faktoren. Es gab jedoch eine hochsignifikante positive Korrelation mit *NT5E* (kodierend für CD73) und *TGFB1* ($p < 0,0001$).

Außerdem gab es eine signifikante Korrelation der Gene mit *CD274* (kodierend für PD-L1) ($p < 0,0001$), was darauf hinweist, dass eine vermehrte Sekretion von Exosomen mit einer immunsuppressiven TMU einhergeht, da dieses Gen die Aktivierung von T-Zellen und die Produktion von Zytokinen hemmt (Sharma & Allison, 2015; Boussiotis, 2016).

Chemokine stellen durch ihre Pro- oder Anti-Tumor-Wirkung bei Krebs ein zweischneidiges Schwert dar (Gowhari Shabgah et al., 2021; Gupta et al., 2018). Bei der Korrelation der Chemokine mit der Fathi-EVsig gab es hauptsächlich Zusammenhänge mit chemotaktischen Faktoren, die mit Tumorentzündungen, Reprogrammierungen, epithelial-mesenchymalen Transitionen und Gefäßneubildungen in Verbindung stehen. Epithelial-mesenchymale Transitionen spielen eine Rolle bei der Tumormetastasierung, da sie durch den Verlust von E-Cadherin die Durchgängigkeit der Basalmembran ermöglichen (Wong et al., 2018).

Zu den signifikantesten Korrelationen zählten *CXCL8* und *CCL27* ($p < 0,001$). *CXCL8* ist an der chemotaktischen Rekrutierung von Neutrophilen involviert und *CCL27* gilt als Mediator der lymphatischen Endothelzellmigration während der tumorassoziierten Lymphangiogenese (Karnezis et al., 2019). *CXCL14*, das ebenfalls in hohem Maße mit der Fathi-EVsig korrelierte ($p < 0,001$), wird bekanntermaßen mit einem verringerten Tumorwachstum und einer Zunahme der in den Tumor eindringenden Lymphozyten in Verbindung gebracht (Parikh et al., 2020).

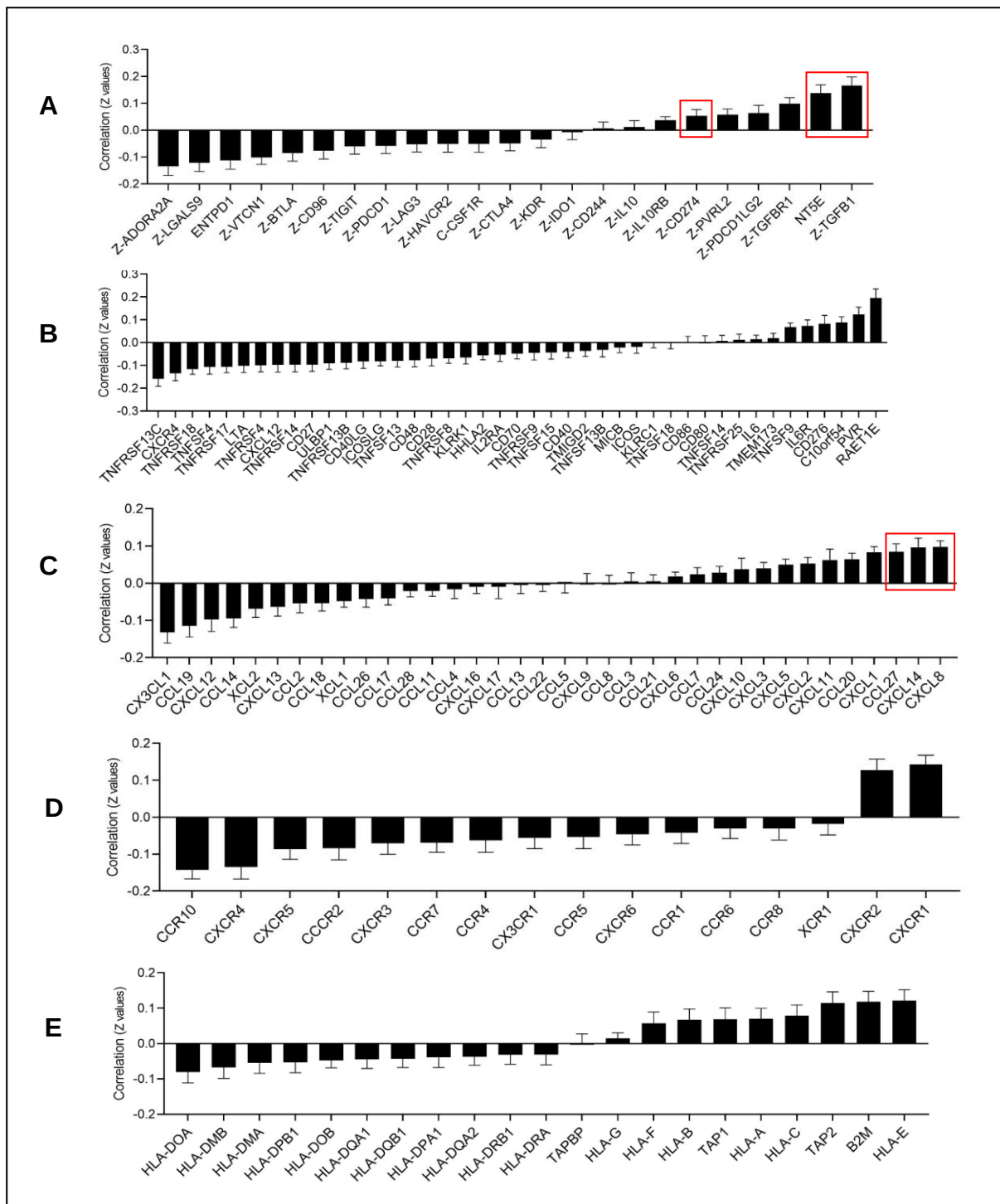


Abb. 9: Darstellung der Zusammenhänge zwischen der Fathi-EVsig und immunmodulierenden Faktoren als Wasserfalldiagramme. **(A)** Immuninhibitoren **(B)** Immunstimulatoren **(C)** Chemokine **(D)** Rezeptoren **(E)** MHC-Moleküle.

Eine starke Korrelation gab es mit den Markern *TGFB1*, *NT5E*, *CD274*, *CXCL8*, *CCL27*, *CXCL14* und *CXCR1/CXCR2*. Alle Werte stellen Mittelwerte $\pm$ Standardfehler dar. Die Daten wurden im Publikationsorgan *Clinical and Experimental Immunology* veröffentlicht.

3.1.5 Einfluss von Mutationen im Tumorgewebe

Um zu ermitteln, welche Rolle Mutationen bei einer hohen Expression der Fathi-Evsig im Tumorgewebe von HNSCC-Patienten spielen, wurden insgesamt 507 Tumorproben untersucht. Die Analyse zeigte, dass Mutationen der Gene, die die Fathi-EVsig beinhaltet, scheinbar keinen einflussnehmenden Faktor im HNSCC darstellen, da im Durchschnitt nur 12,3 % der Proben mutiert waren. In der **Abbildung 10** ist ersichtlich, dass *CIT* mit 13 Proben den größten Anteil an Mutationen aufwies. Aufgrund dieser geringen Anzahl an mutierten Proben wurden die Unterschiede zwischen HPV-positiven und HPV-negativen Tumoren im nächsten Kapitel nicht weiter herausgearbeitet.

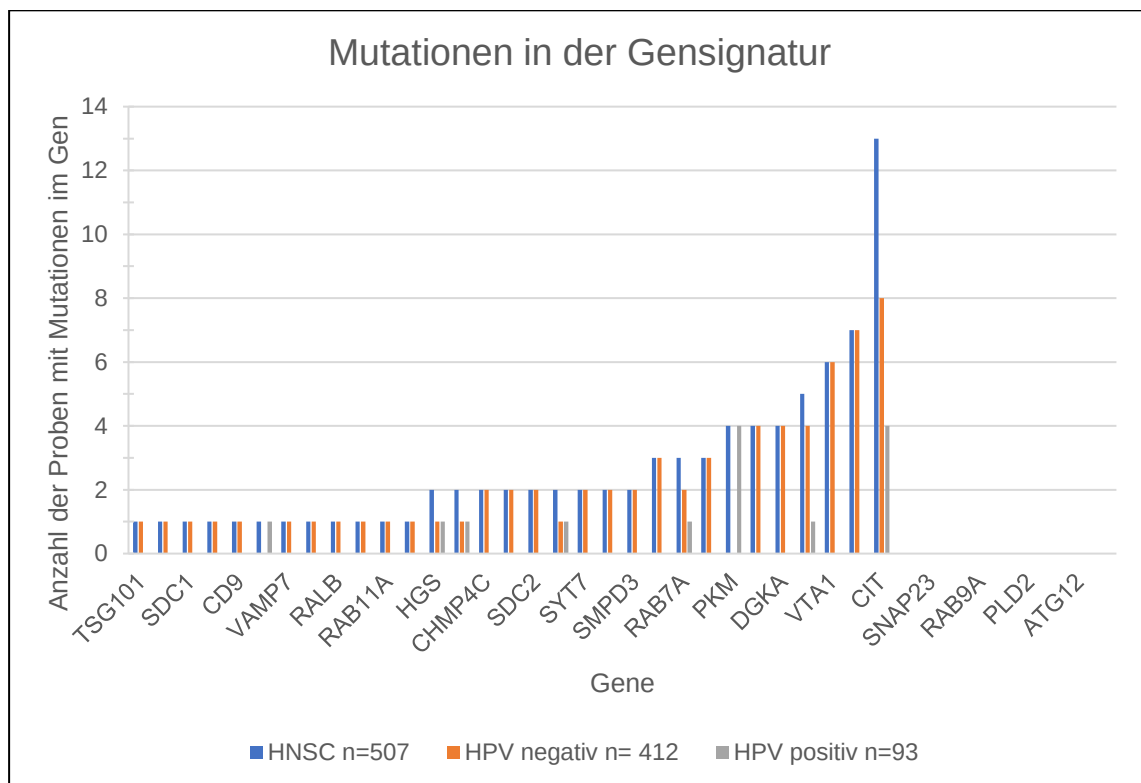


Abb. 10: Ergebnis der Mutationsanalyse der Fathi-EVsig. Das hier dargestellte Säulendiagramm zeigt, dass 16 Gene der Fathi-EVsig mit einer vernachlässigbaren Mutationsrate gekennzeichnet waren.

3.2 Analyse der Fathi-EVsig unter Berücksichtigung des HPV-Infektionsstatus

Die Dualität von karzinogen- und viral-induziertem Krebs ist ein wichtiger Aspekt von HNSCCs und bietet die Möglichkeit, die Unterschiede in der Überlebensprognose und der Immunlandschaft von zwei verschiedenen Krebsursachen zu bewerten, die an einem ähnlichen anatomischen Ort auftreten (Cillo et al., 2020). Daher wurde in diesem Kapitel untersucht, ob Exosomen eine unterschiedliche Rolle beim HPV-positiven und HPV-negativen HNSCC spielen.

3.2.1 Vergleich der Überlebensprognosen der Patienten beim HPV-positiven und HPV-negativen HNSCC

Um den Einfluss des HPV-Infektionsstatus auf die Überlebensprognose zu überprüfen, wurde die Genexpression der Fathi-EVsig in Patientenproben mit HPV-positiven und HPV-negativen HNSCC untersucht und das Ergebnis wurde in der **Abbildung 11** dargestellt. Man erkennt, dass die Mehrzahl der Gene im HPV-negativen HNSCC mit einem schlechten Gesamtüberleben verbunden war, wohingegen die Prognose bei einer hohen Genexpression der Fathi-EVsig im HPV-positiven Karzinom besser ausfiel. Eine Übersicht der signifikanten Werte wurde in der **Tabelle 5** zusammengefasst.

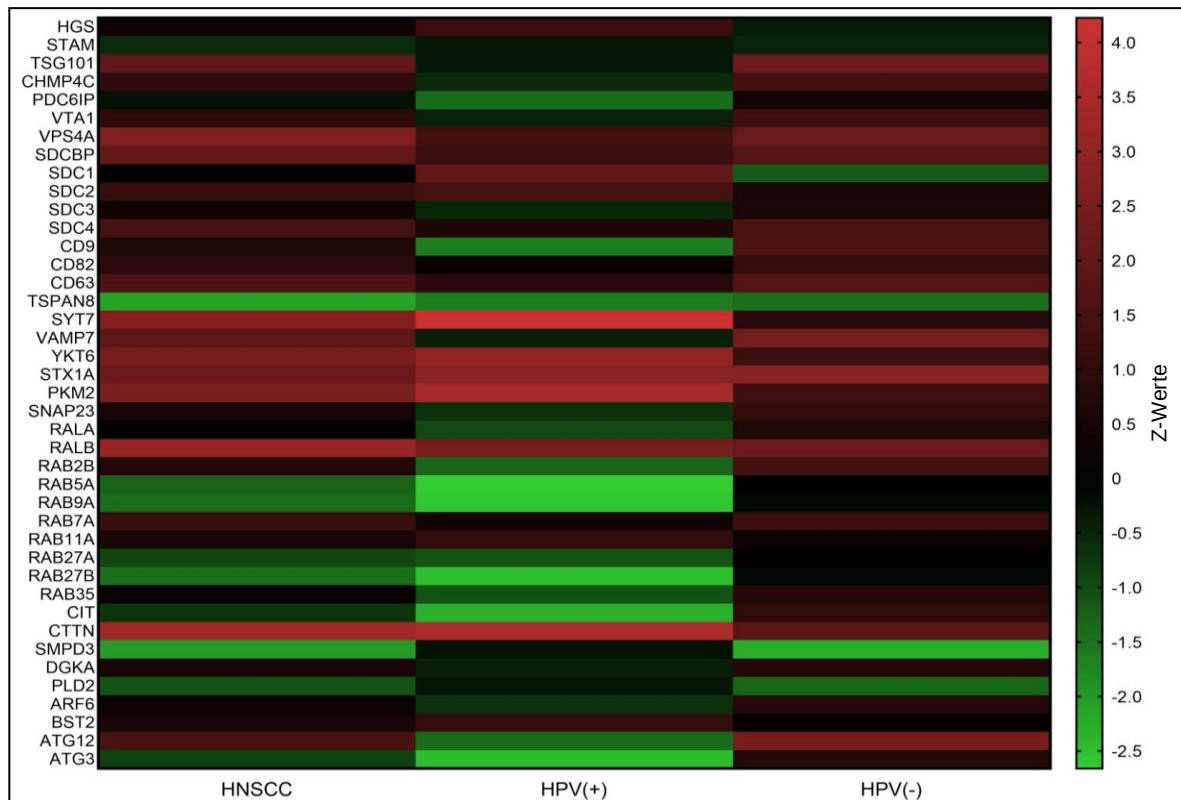


Abb. 11: Vergleich der Überlebensprognosen bei unterschiedlichem HPV-Infektionsstatus von HNSCC-Patienten als Heatmap. Die roten Blöcke stehen für eine schlechtere und die grünen Blöcke für eine bessere Prognose. Die Gensignatur war im HPV-positiven HNSCC mit einer besseren Überlebensprognose verbunden.

Tab. 5: Vergleich der Überlebenswahrscheinlichkeiten der Fathi-EVsig im HPV-positiven und HPV-negativen HNSCC mit TIMER 2.0 aus den **Abbildungen 11, 16** und **17**.

****p < 0.0001; ***p < 0.001; **p < 0.01; *p < 0.05; ns p > 0.05

Gene	HNSCC				HPV(+)-HNSCC				HPV(-)-HNSCC			
	p-Wert	Log-Rank-Test	Z-Wert	HR	p-Wert	Log-Rank-Test	Z-Wert	HR	p-Wert	Log-Rank-Test	Z-Wert	HR
<i>HGS</i>	ns	ns	-0,23	1,08	ns	ns	1,38	1,26	ns	ns	-0,84	1,08
<i>STAM</i>	**	ns	-0,69	0,82	ns	ns	-0,29	0,87	*	ns	-0,61	0,84
<i>TSG101</i>	ns	ns	1,89	1,03	ns	ns	0,26	0,90	ns	ns	2,08	1,07
<i>CHMP4C</i>	ns	ns	1,13	1,07	ns	ns	0,11	0,95	ns	ns	1,40	1,11
<i>PDCD6IP</i>	ns	ns	0,01	0,89	ns	ns	-0,54	0,75	ns	ns	0,38	0,93
<i>VTA1</i>	ns	ns	0,91	0,91	ns	ns	0,21	1,02	ns	ns	1,16	0,92
<i>VPS4A</i>	ns	ns	2,22	1,12	ns	ns	1,17	1,25	ns	ns	1,66	1,08
<i>SDCBP</i>	ns	ns	2,17	1,06	ns	ns	1,48	1,17	ns	ns	1,71	1,03
<i>SDC1</i>	ns	ns	-0,04	1,04	*	*	2,10	1,71	ns	ns	-1,11	0,98
<i>SDC2</i>	ns	ns	0,89	1,11	*	ns	1,75	1,74	ns	ns	0,35	1,01
<i>SDC3</i>	ns	ns	-0,08	0,98	ns	ns	-0,99	0,91	ns	ns	0,34	0,99
<i>SDC4</i>	ns	ns	1,48	0,98	ns	ns	1,01	1,03	ns	ns	1,45	1,03
<i>CD9</i>	ns	ns	1,04	0,88	*	ns	-1,48	0,63	ns	ns	1,78	1,00
<i>CD82</i>	ns	ns	0,66	1,07	ns	ns	0,04	1,13	ns	ns	0,94	1,08
<i>CD63</i>	ns	ns	1,63	1,06	ns	ns	0,87	0,88	ns	ns	1,68	1,14
<i>TSPAN8</i>	ns	ns	-1,62	0,91	ns	ns	-0,67	0,76	ns	ns	-1,21	0,97
<i>SYT7</i>	*	ns	2,08	1,20	*	****	4,00	1,89	ns	ns	0,35	1,13
<i>VAMP7</i>	ns	ns	1,85	1,10	ns	ns	0,15	0,95	ns	ns	2,13	1,14
<i>YKT6</i>	****	ns	1,97	1,37	ns	*	2,47	1,36	*	ns	0,83	1,20
<i>STX1A</i>	ns	ns	1,96	1,14	*	**	3,09	1,81	ns	ns	0,57	0,99
<i>PKM2</i>	*	ns	2,40	1,16	ns	**	3,25	1,26	ns	ns	1,21	1,12
<i>SNAP23</i>	ns	ns	0,51	1,00	ns	ns	-0,43	0,89	ns	ns	0,93	1,03
<i>RALA</i>	ns	ns	0,00	0,88	ns	ns	-0,71	0,78	ns	ns	0,39	0,92

<i>RALB</i>	*	*	2,92	1,16	*	*	2,18	1,69	ns	ns	1,99	1,05
<i>RAB2B</i>	ns	ns	0,60	1,01	ns	ns	-0,90	0,85	ns	ns	1,20	1,10
<i>RAB5A</i>	ns	ns	-1,04	0,89	ns	ns	-1,87	0,67	ns	ns	-0,02	0,97
<i>RAB9A</i>	ns	ns	-1,16	0,94	ns	*	-2,07	0,79	ns	ns	-0,08	0,98
<i>RAB7A</i>	ns	ns	0,98	1,04	ns	ns	0,33	0,90	ns	ns	1,14	1,05
<i>RAB11A</i>	ns	ns	0,93	1,02	ns	ns	1,56	1,32	ns	ns	0,54	0,99
<i>RAB27A</i>	ns	ns	-1,18	0,96	ns	ns	-0,83	0,75	ns	ns	-0,31	1,02
<i>RAB27B</i>	*	ns	-1,46	0,84	ns	*	-2,15	0,72	ns	ns	-0,22	0,87
<i>RAB35</i>	ns	ns	-0,09	0,96	ns	ns	-0,83	0,95	ns	ns	0,32	0,99
<i>CIT</i>	*	ns	-0,74	0,94	*	ns	-1,64	0,61	ns	ns	0,65	1,02
<i>CTTN</i>	**	**	3,13	1,23	*	*	3,04	1,63	ns	ns	1,77	1,12
<i>SMPD3</i>	**	ns	-2,21	0,81	ns	ns	-0,29	0,77	*	*	-2,47	0,82
<i>DGKA</i>	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0,22	1,03	ns	ns	0,71	0,92
<i>PLD2</i>	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0,22	1,06	ns	ns	-1,52	0,96
<i>ARF6</i>	ns	ns	ns	ns	*	ns	-0,28	0,63	ns	ns	0,67	1,02
<i>BST2</i>	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0,65	1,28	ns	ns	0,17	1,03
<i>ATG12</i>	ns	ns	ns	ns	ns	ns	-0,71	0,84	*	ns	2,07	1,21
<i>ATG3</i>	ns	ns	ns	ns	*	*	-2,55	0,65	ns	ns	0,57	1,06

3.2.2 Vergleich der Immunlandschaft beim HPV-positiven und HPV-negativen HNSCC

Um herauszufinden, ob die Produktion von TEX mit einem unterschiedlichen Immunprofil beim HPV-positiven und HPV-negativen HNSCC einhergeht, wurde die Expression der Gene, die mit der Produktion von extrazellulären Vesikeln im Zusammenhang stehen, und deren Auswirkungen auf die Immunzellinfiltration getrennt für HPV-positive und HPV-negative HNSCCs analysiert.

Die Heatmap in der **Abbildung 12** zeigt, dass das Expressionsniveau der Fathi-EVsig mit einem unterschiedlichen immunologischen Profil bei HPV-positiven und HPV-negativen Patienten verbunden war. Eine hohe Genexpression der Fathi-EVsig im HPV-positiven HNSCC korrelierte mit einer erhöhten Infiltrationshäufigkeit von Tregs

und einer verringerten Infiltrationshäufigkeit von CAFs und MDSCs, verglichen mit HPV-negativen HNSCC-Geweben ($p < 0,05$).

Außerdem ergab die Analyse der Immunzellinfiltration, dass Exosomen eher mit Makrophagen, Neutrophilen und DCs als mit Tregs, CAFs, Endothelzellen und MDSCs interagieren. Aus den **Tabellen 6** und **7** können die signifikanten p-Werte entnommen werden.

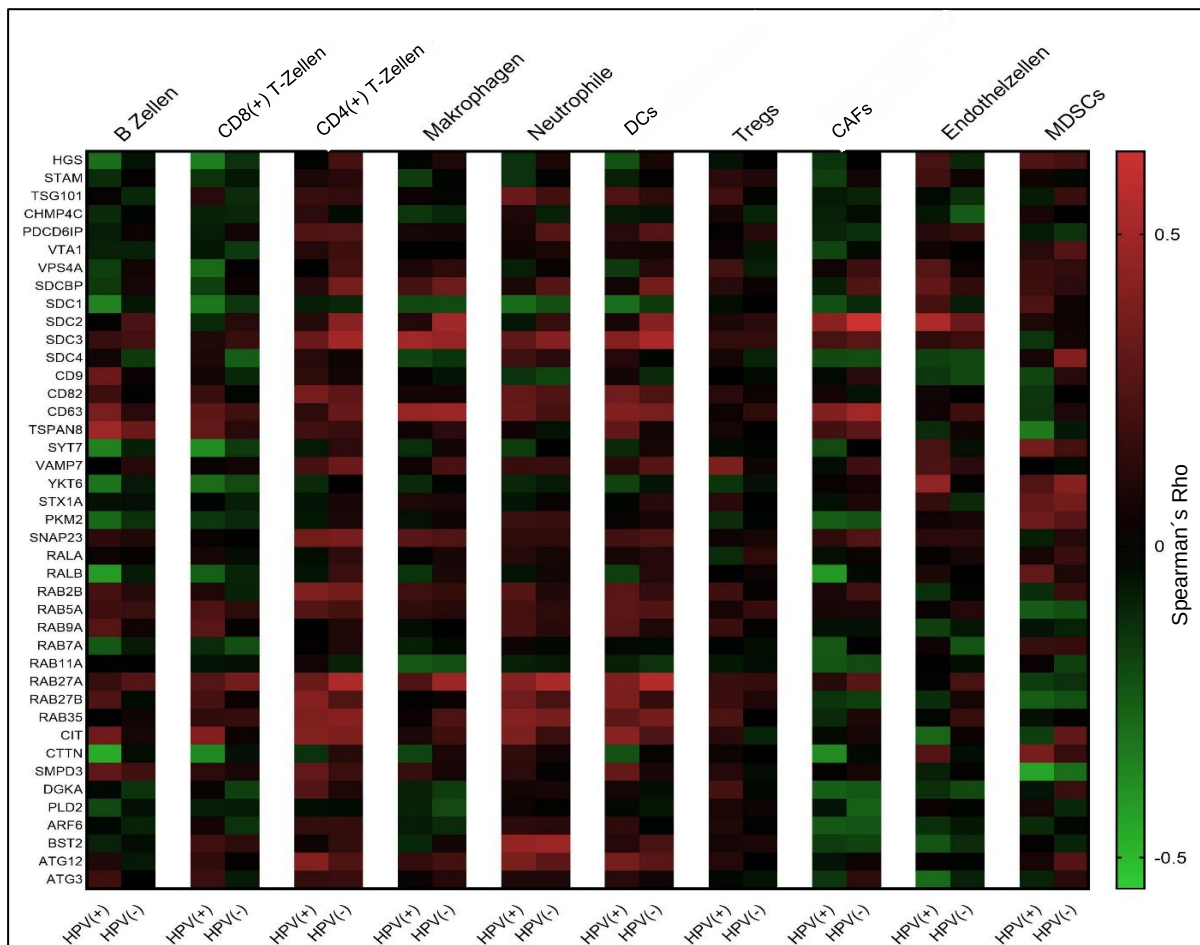


Abb. 12: Ergebnis der Korrelationsanalyse der Genexpression der Fathi-EVsig mit der Immunzellinfiltration im HPV-positiven und HPV-negativen HNSCC als Heatmap. Die grünen Blöcke kennzeichnen eine negative Korrelation und die roten Blöcke eine positive Korrelation. Die Immunlandschaft im HPV-positiven HNSCC war mit einer erhöhten Infiltrationshäufigkeit von Tregs und einer verringerten Infiltrationshäufigkeit von CAFs und MDSCs im Vergleich zum HPV-negativen HNSCC verbunden.

Tab. 6: Korrelation der Fathi-EVsig mit Immunzellmarkern im HPV-negativen HNSCC mit TIMER2.0 aus der **Abbildung 12**.

****p < 0.0001; ***p < 0.001; **p < 0.01; *p < 0.05; ns p > 0.05;

* = positive Spearman-Korrelation, * = negative Spearman-Korrelation

HPV(-)- HNSCC											
Gene	Purity	B-Zellen	CD8(+) T-Zellen	CD4(+) T-Zellen	Makrophagen	Neutrophile	DCs	Tregs	CAFs	Endothelzellen	MDSCs
<i>HGS</i>	ns	ns	**	****	ns	ns	ns	ns	ns	*	****
<i>STAM</i>	ns	ns	ns	*	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
<i>TSG101</i>	ns	*	*	**		****	**	ns	ns	**	***
<i>CHMP4C</i>	ns	ns	*	ns	*	ns	ns	ns	ns	****	ns
<i>PDCD6IP</i>	***	ns	ns	****	ns	****	****	*	**	**	**
<i>VTA1</i>	ns	ns	**	***	ns	ns	ns	ns	ns	ns	****
<i>VPS4A</i>	***	ns	ns	****	**		*	ns	***	ns	**
<i>SDCBP</i>	ns	ns	ns	****	****	****	****	ns	****	**	**
<i>SDC1</i>	ns	ns	**	*	****	****	**	ns	*	ns	ns
<i>SDC2</i>	ns	****	*	****	****	***	****	*	****	****	ns
<i>SDC3</i>	***	****	***	****	****	****	****	**	****	***	ns
<i>SDC4</i>	ns	**	****	ns	**	*	ns	ns	****	***	****
<i>CD9</i>	****	ns	*	ns	ns	***	*	ns	*	****	*
<i>CD82</i>	**	ns	ns	****	ns	****	****	ns	ns	ns	ns
<i>CD63</i>	ns	*	****	****	****	****	****	**	****	***	ns
<i>TSPAN8</i>	ns	****	*	***	**	ns	ns	ns	****	ns	ns
<i>SYT7</i>	ns	ns	**	**	ns	ns	ns	ns	ns	ns	****
<i>VAMP7</i>	ns	*	ns	****	****	***	****	ns	****	*	ns
<i>YKT6</i>	ns	ns	****	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	****
<i>STX1A</i>	**	ns	ns	ns	ns	ns	*	ns	ns	*	****
<i>PKM2</i>	ns	**	*	ns	ns	***	ns	ns	****	ns	****
<i>SNAP23</i>	ns	ns	ns	****	****	**	****	ns	****	*	*
<i>RALA</i>	ns	ns	ns	**	ns	ns	*	**	ns	ns	***
<i>RALB</i>	ns	ns	ns	***	ns	ns	*	ns	ns	ns	ns

<i>RAB2B</i>	ns	*	ns	****	**	*	**	ns	***	ns	***
<i>RAB5A</i>	ns	***	**	****	*	**	****	**	ns	*	****
<i>RAB9A</i>	ns	ns	ns	ns	ns	*	ns	ns	ns	ns	ns
<i>RAB7A</i>	ns	ns	****	ns	ns	ns	ns	ns	ns	****	**
<i>RAB11A</i>	ns	ns	ns	ns	****	ns	**	ns	****	ns	***
<i>RAB27A</i>	****	****	****	****	****	****	****	**	****	****	**
<i>RAB27B</i>	***	ns	ns	****	ns	****	**	ns	***	ns	****
<i>RAB35</i>	ns	ns	**	****	****	****	****	ns	ns	***	ns
<i>CIT</i>	****	ns	ns	****	***	***	****	ns	ns	ns	****
<i>CTTN</i>	ns	ns	ns	*	ns	ns	ns	ns	ns	ns	***
<i>SMPD3</i>	**	****	ns	***	ns	ns	ns	ns	ns	ns	**
<i>DGKA</i>	ns	**	***	ns	****	ns	ns	ns	****	****	***
<i>PLD2</i>	***	ns	ns	ns	****	ns	ns	ns	****	ns	*
<i>ARF6</i>	ns	ns	**	**	*	*	ns	ns	****	ns	ns
<i>BST2</i>	****	ns	**	**	ns	****	****	ns	***	*	ns
<i>ATG12</i>	ns	ns	ns	****	****	****	****	ns	ns	ns	****
<i>ATG3</i>	*	ns	ns	***	*	ns	ns	ns	**	ns	*

Tab. 7: Korrelation der Fathi-EVsig mit Immunzellmarkern im HPV-positiven HNSCC mit TIMER2.0 aus der **Abbildung 12**.

****p < 0.0001; ***p < 0.001; **p < 0.01; *p < 0.05; ns p > 0.05,

* = positive Spearman-Korrelation, * = negative Spearman-Korrelation

HPV(+)- HNSCC											
Gene	Purity	B-Zellen	CD8(+) T-Zellen	CD4(+) T-Zellen	Makrophagen	Neutrophile	DCs	Tregs	CAFs	Endothelzellen	MDSCs
<i>HGS</i>	ns	**	**	ns	ns	ns	*	ns	ns	*	*
<i>STAM</i>	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
<i>TSG101</i>	ns	ns	ns	ns	ns	**	*	ns	ns	ns	ns
<i>CHMP4C</i>	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
<i>PDCD6IP</i>	ns	ns	ns	*	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
<i>VTA1</i>	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
<i>VPS4A</i>	ns	ns	*	ns	ns	ns	ns	ns	ns	*	ns
<i>SDCBP</i>	*	ns	ns	ns	*	ns	ns	ns	ns	**	ns
<i>SDC1</i>	ns	**	**	ns	ns	**	**	ns	*	*	*
<i>SDC2</i>		ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	****	****	ns
<i>SDC3</i>	**	ns	ns	**	****	**	***	ns	*	ns	ns
<i>SDC4</i>	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
<i>CD9</i>	ns	**	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
<i>CD82</i>	ns	ns	ns	***	ns	**	**	ns	ns	ns	ns
<i>CD63</i>	ns	***	*	ns	****	**	***	ns	***	ns	ns
<i>TSPAN8</i>	ns	****	**	ns	ns	ns	**	ns	ns	ns	**
<i>SYT7</i>	ns	**	***	ns	ns	ns	ns	ns	ns	*	***
<i>VAMP7</i>	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	***	ns	*	ns
<i>YKT6</i>	ns	**	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	****	*
<i>STX1A</i>	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	**
<i>PKM2</i>	ns	*	ns	ns	ns	ns	ns	ns	*	ns	**
<i>SNAP23</i>	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
<i>RALA</i>	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
<i>RALB</i>	ns	***	*	ns	ns	ns	ns	ns	****	ns	**

<i>RAB2B</i>	ns	ns	ns	***	ns	*	*	ns	ns	ns	ns
<i>RAB5A</i>	ns	ns	*	*	ns	ns	*	ns	ns	ns	*
<i>RAB9A</i>	ns	*	*	ns	ns	ns	*	ns	ns	ns	ns
<i>RAB7A</i>	ns	*	ns	ns	ns	ns	ns	ns	*	ns	ns
<i>RAB11A</i>	ns	ns	ns	ns	*	ns	ns	ns	*	ns	ns
<i>RAB27A</i>	ns	ns	ns	**	*	****	***	ns	ns	ns	ns
<i>RAB27B</i>	ns	ns	ns	***	ns	**	***	ns	ns	ns	*
<i>RAB35</i>	ns	ns	ns	***	ns	****	**	*	ns	ns	ns
<i>CIT</i>	*	**	***	***	ns	***	*****	ns	ns	**	ns
<i>CTTN</i>	ns	****	***	ns	ns	ns	*	ns	***	*	***
<i>SMPD3</i>	***	**	ns	**	ns	ns	**	ns	ns	ns	****
<i>DGKA</i>	ns	ns	ns	*	ns	ns	ns	*	*	ns	ns
<i>PLD2</i>	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
<i>ARF6</i>	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
<i>BST2</i>	ns	ns	ns	ns	ns	****	ns	ns	ns	*	ns
<i>ATG12</i>	ns	ns	ns	***	ns	***	***	ns	ns	ns	ns
<i>ATG3</i>	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	**	ns

Die Makrophagen wurden wieder in M0-, M1- und M2-Makrophagen eingeteilt. Die Ergebnisse der Korrelation wurden durch eine Heatmap für das HPV-positive und das HPV-negative HNSCC in der **Abbildung 13** präsentiert. Es stellte sich heraus, dass Exosomen die Infiltration mit naiven M0-Makrophagen sowohl im HPV-positiven als auch im HPV-negativen HNSCC stimulierten. HPV-negative HNSCCs gingen mit einer erhöhten Infiltrationshäufigkeit von naiven M0-Makrophagen und einer verringerten Infiltrationshäufigkeit von M1-Makrophagen im Vergleich zu HPV-positiven HNSCCs einher. In der **Tabelle 8** wurden die signifikanten p-Werte aufgelistet.

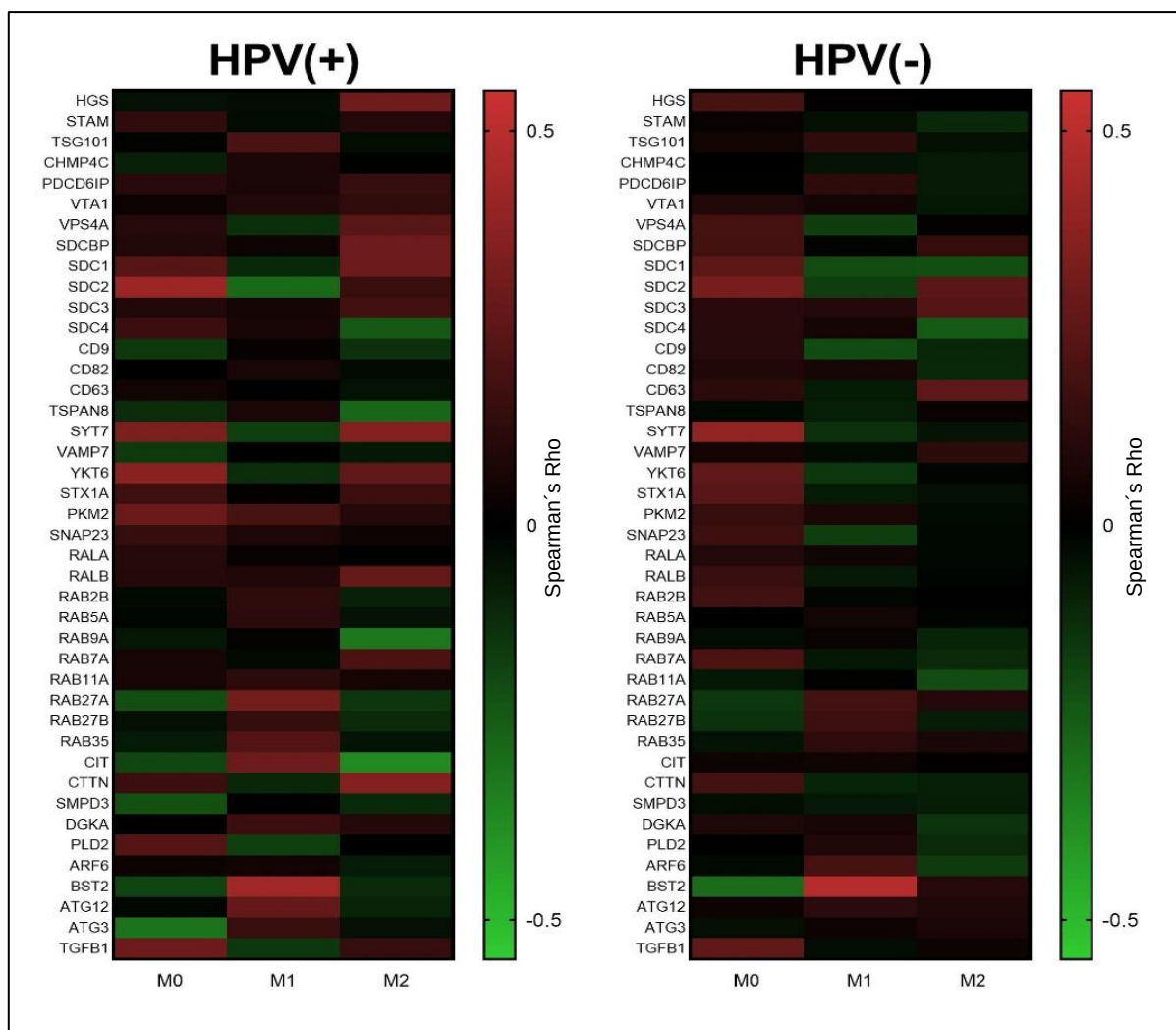


Abb. 13: Vergleich der Expressionsniveaus der Fathi-EVs im HPV-positiven und HPV-negativen HNSCC als Heatmap. Eine hohe Genexpression der Fathi-EVs war mit einer erhöhten Infiltrationshäufigkeit (rote Blöcke) der naiven M0-Makrophagen und mit einer verringerten Infiltrationshäufigkeit (grüne Blöcke) der M1-Makrophagen im HPV-negativen HNSCC verbunden.

Tab. 8: Korrelation der Fathi-EVsig mit Makrophagen mit TIMER 2.0 aus der **Abbildung 13.**

****p < 0.0001; ***p < 0.001; **p < 0.01; *p < 0.05; ns p > 0.05;

* = positive Spearman-Korrelation, * = negative Spearman-Korrelation

	HPV(+)-HNSCC			HPV(-)-HNSCC		
Gene	M0	M1	M2	M0	M1	M2
<i>HGS</i>	ns	ns	**	***	ns	ns
<i>STAM</i>	ns	ns	ns	ns	ns	*
<i>TSG101</i>	ns	ns	ns	ns	**	ns
<i>CHMP4C</i>	ns	ns	ns	ns	ns	ns
<i>PDCD6IP</i>	ns	ns	ns	ns	*	ns
<i>VTA1</i>	ns	ns	ns	ns	ns	ns
<i>VPS4A</i>	ns	ns	*	***	***	ns
<i>SDCBP</i>	ns	ns	**	***	ns	**
<i>SDC1</i>	*	ns	**	****	****	****
<i>SDC2</i>	****	**	ns	****	***	****
<i>SDC3</i>	ns	ns	ns	*	ns	****
<i>SDC4</i>	ns	ns	*	*	ns	****
<i>CD9</i>	ns	ns	ns	*	****	*
<i>CD82</i>	ns	ns	ns	ns	ns	*
<i>CD63</i>	ns	ns	ns	*	ns	****
<i>TSPAN8</i>	ns	ns	**	ns	ns	ns
<i>SYT7</i>	**	ns	***	****	**	ns
<i>VAMP7</i>	ns	ns	ns	ns	ns	*
<i>YKT6</i>	***	ns	*	****	**	ns
<i>STX1A</i>	ns	ns	ns	****	ns	ns
<i>PKM2</i>	**	ns	ns	**	ns	ns
<i>SNAP23</i>	ns	ns	ns	***	***	ns
<i>RALA</i>	ns	ns	ns	ns	ns	ns
<i>RALB</i>	ns	ns	*	**	ns	ns
<i>RAB2B</i>	ns	ns	ns	***	ns	ns
<i>RAB5A</i>	ns	ns	ns	ns	ns	ns
<i>RAB9A</i>	ns	ns	**	ns	ns	ns

<i>RAB7A</i>	ns	ns	ns	****	ns	*
<i>RAB11A</i>	ns	ns	ns	ns	ns	****
<i>RAB27A</i>	ns	**	ns	**	***	ns
<i>RAB27B</i>	ns	ns	ns	**	**	ns
<i>RAB35</i>	ns	*	ns	ns	*	ns
<i>CIT</i>	ns	**	***	ns	ns	ns
<i>CTTN</i>	ns	ns	***	***	ns	ns
<i>SMPD3</i>	*	ns	ns	ns	ns	ns
<i>DGKA</i>	ns	ns	ns	ns	ns	**
<i>PLD2</i>	*	ns	ns	ns	ns	*
<i>ARF6</i>	ns	ns	ns	ns	***	**
<i>BST2</i>	ns	****	ns	****	****	*
<i>ATG12</i>	ns	**	ns	ns	*	ns
<i>ATG3</i>	**	ns	ns	ns	ns	ns
<i>TGFB1</i>	**	ns	ns	****	ns	ns

3.3 Analyse der einzelnen Gene, die die Fathi-EVsig beinhaltet

Um zu ermitteln, welche Gene besonders stark im HNSCC- und im normalen soliden Gewebe exprimiert werden und welche Gene besonders großen Einfluss auf die Immunzellinfiltration sowie auf die Überlebensprognose haben, wurde jedes Gen der Signatur einzeln betrachtet und analysiert.

3.3.1 Vergleich der Genexpression im Tumor- und normalen soliden Gewebe

Die Mittelwerte der Genexpressionen der an der Vesikelsekretion beteiligten Gene sind in der **Abbildung 14** dargestellt. Die Analyse ergab, dass 19 der 41 Gene der Fathi-EVsig im HNSCC-Gewebe hochreguliert waren, während die Expressionslevel von 20 Genen im HNSCC, verglichen mit normalen soliden Geweben, herunterreguliert waren. Nur die Gene *SDC1* und *CD63* zeigten keine Tendenz zur vermehrten Expression im Tumor- oder normalen soliden Gewebe. 28 Gene der Fathi-EVsig zeigten einen statistisch signifikanten p-Wert.

Die Gene *STX1A* ($p = 0.000$) und *BST2* ($p = 0.000$) waren im HNSCC am stärksten hochreguliert. *STX1A* ist am Andocken von synaptischen Vesikeln an der präsynaptischen Plasmamembran beteiligt (Craig et al., 2015) und *BST2* spielt beim Wachstum und der Entwicklung von B-Zellen eine Rolle (Ishikawa et al., 1995).

Besonders herunterreguliert und somit vermehrt im normalen soliden Gewebe vorhanden war das Gen *TSPAN8* ($p = 0,000$), dem eine Rolle bei der Regulierung von Zellentwicklung, Aktivierung, Wachstum und Mortalität zugeschrieben wird (Zhu et al., 2019).

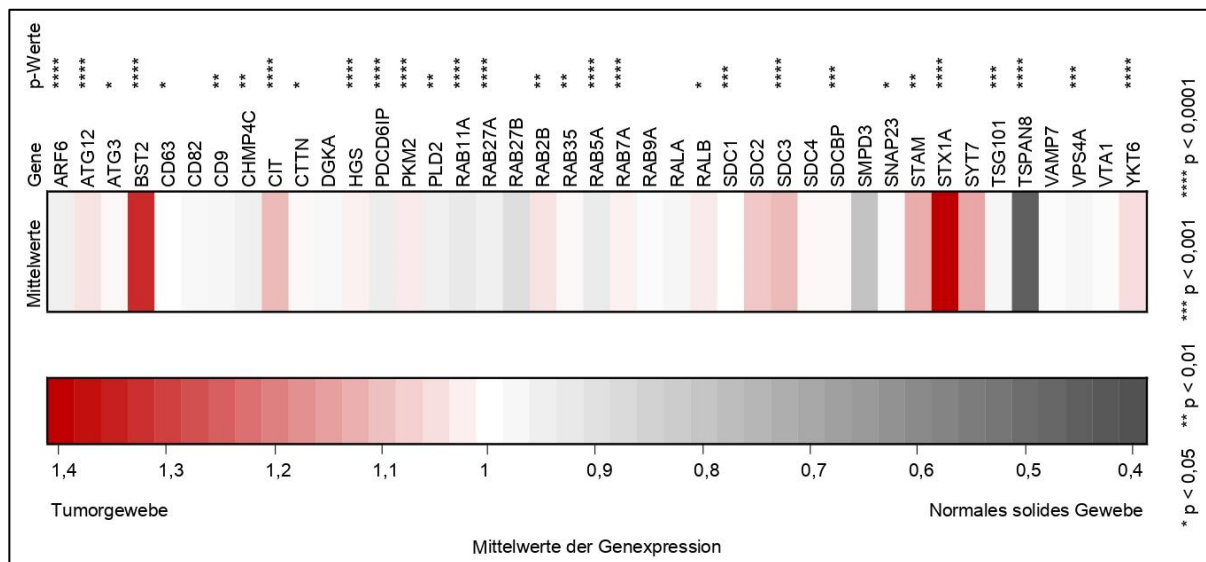


Abb. 14: Darstellung der Genexpressionswerte der Fathi-EVsig im normalen soliden Gewebe (n = 44) und im primären HNSCC (n = 564) als Heatmap. 19 Gene waren im HNSCC hochreguliert (rote Blöcke) und 20 Gene herunterreguliert (graue Blöcke). Die Daten wurden im Publikationsorgan *Clinical and Experimental Immunology* veröffentlicht.

3.3.2 Einfluss der Gene auf die Überlebensprognose der Patienten

Zur allgemeinen Übersicht zeigt die erstellte Heatmap in der **Abbildung 15**, dass etwa die Hälfte der Gene, die die Fathi-EVsig beinhaltet, bei hoher Genexpression mit einem schlechten Überleben assoziiert war.

Sechs Gene der Fathi-EVsig korrelierten statistisch signifikant negativ und zwei Gene statistisch signifikant positiv mit dem medianen Gesamtüberleben von 200 Monaten. Bei gleichzeitiger Zunahme der Genexpression der sechs Gene *YKT6*, *SYT7*, *CD63*, *ATG12*, *CTTN* und *PKM2* wies die beobachtete Tumor-Patientengruppe ein größeres Sterberisiko auf.

Die beiden Gene *TSPAN8* und *SMPD3* stellten ein kleineres Sterberisiko für die beobachtete Tumor-Patientengruppe bei gleichzeitigem Anstieg der Genexpression dar.

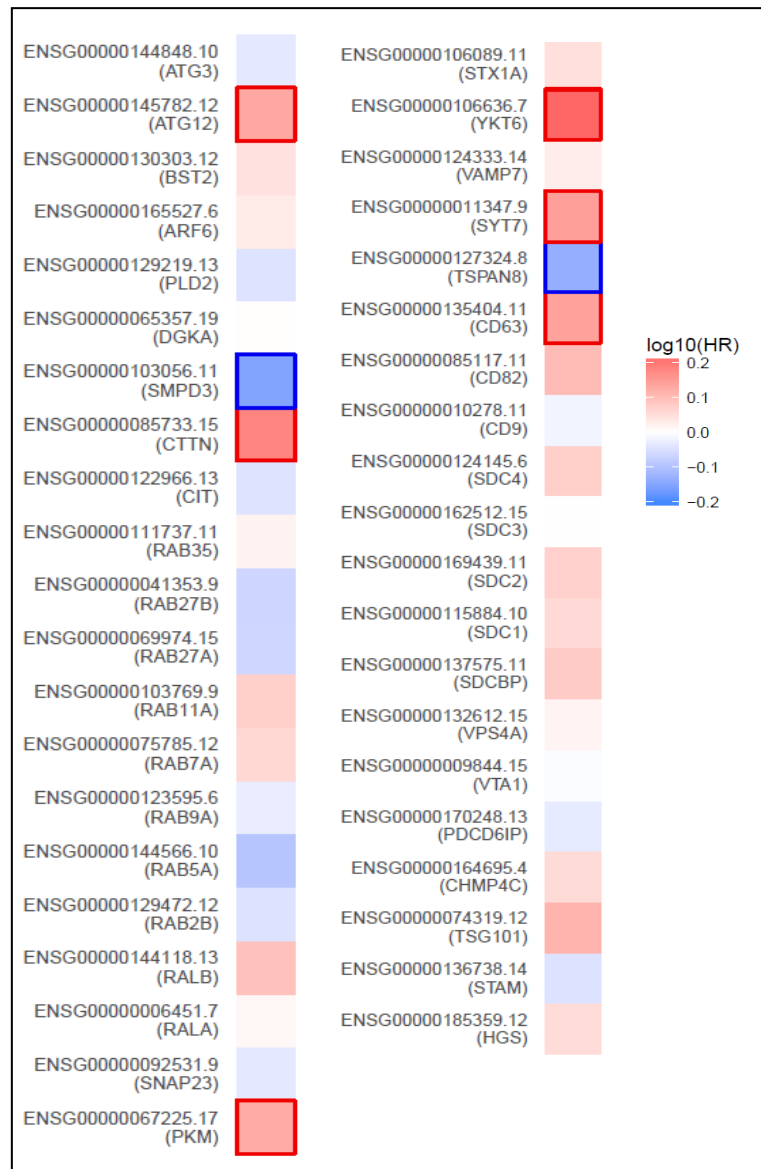


Abb. 15: Ergebnis der Korrelationsanalyse der Fathi-EVsig mit dem medianen Gesamtüberleben von 200 Monaten als Heatmap. Die roten Blöcke stellen ein größeres und die blauen Blöcke ein kleineres Sterberisiko bei der Zunahme der Genexpression dar. Dick umrandete Blöcke bedeuten, dass der p-Wert statistisch signifikant ist. Die Gene *YKT6*, *SYT7*, *CD63*, *ATG12*, *CTTN* und *PKM2* stellten ein größeres Sterberisiko dar, wohingegen die Gene *TSPAN8* und *SMPD3* mit einem kleineren Sterberisiko bei gleichzeitigem Anstieg der Genexpression verbunden waren.

Die Gene mit statistisch signifikantem p-Wert wurden zusätzlich mithilfe des Tools TIMER2.0 untersucht und die Überlebenszeit auf 5 Jahre reduziert. Das Tool erstellte Kaplan-Meier-Überlebenskurven, die in den **Abbildungen 16** und **17** zu finden sind. Diese bestätigten, dass eine hohe Expression der Gene *SYT7* ($p = 0,0125$), *YKT6* ($p = 0,0000305$), *PKM2* ($p = 0.0416$) und *CTTN* ($p = 0,00539$) signifikant mit einer schlechteren 5-Jahres-Überlebensrate verbunden war und die Überlebensrate bei einer hohen Expression von *SMPD3* ($p = 0,00516$) in der Tumor-Patientengruppe signifikant besser war.

Darüber hinaus war auch eine hohe Genexpression von *RALB* ($p = 0,0418$) bei der Analyse mit TIMER2.0 mit einer signifikant schlechteren Überlebensrate assoziiert.

Die Gene *ATG12*, *CD63* und *TSPAN8* zeigten bei der Analyse mit TIMER2.0 keine statistische Signifikanz. Eine Übersicht der signifikanten p-Werte, Log-Rank-Tests, Z-Werte und HR-Werte der Analyse mit TIMER2.0 kann der **Tabelle 5** entnommen werden.

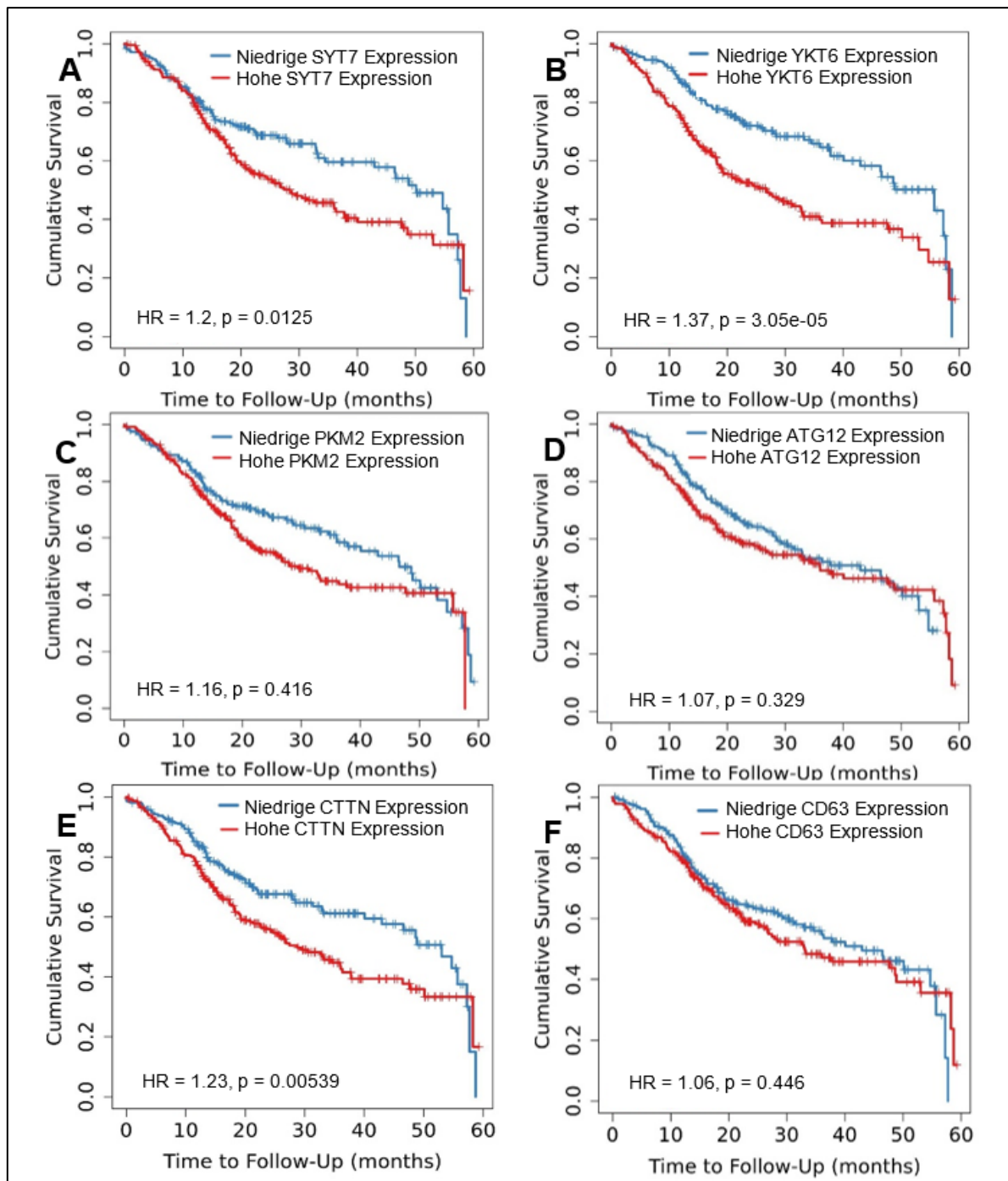


Abb. 16: Kaplan-Meier-Überlebenskurven einzelner Gene der Fathi-EVsig im HNSCC bei hoher Genexpression (rote Linie) im Vergleich zu niedriger Genexpression (blaue Linie). **(A)** SYT7 **(B)** YKT6 **(C)** PKM2 **(D)** ATG12 **(E)** CTTN **(F)** CD63

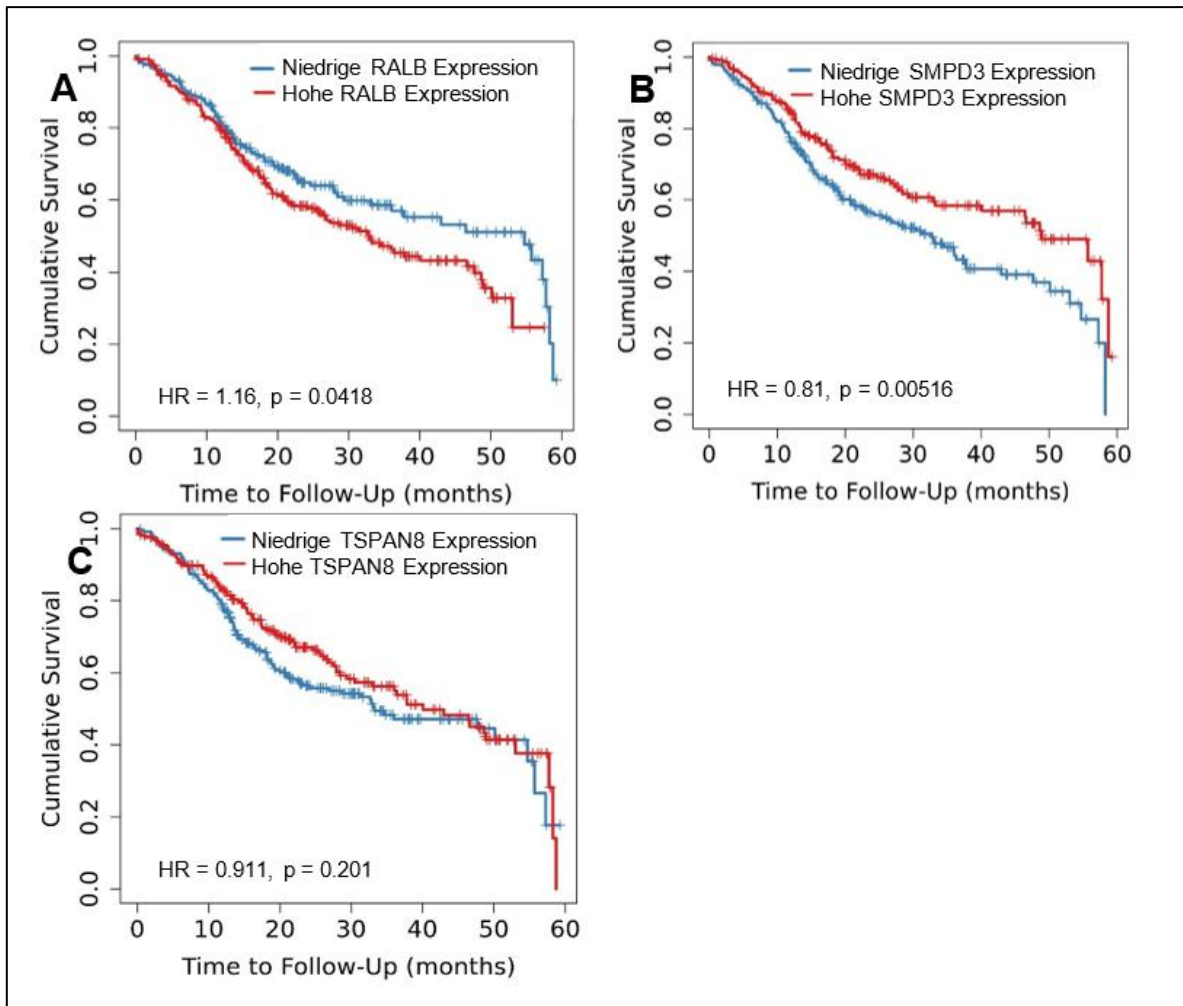


Abb. 17: Kaplan-Meier-Überlebenskurven einzelner Gene der Fathi-EVsig im HNSCC bei hoher Genexpression (rote Linie) im Vergleich zu niedriger Genexpression (blaue Linie). **(A)** *RALB* **(B)** *SMPD3* **(C)** *TSPAN8*

3.3.3 Einfluss der Gene auf die Immunlandschaft

Die spezifische Gestaltung der Immunlandschaft, die im Kapitel 3.1.4 beobachtet wurde, war auch bei den Genen *SYT7*, *PKM2*, *CTTN* und *RALB*, die bei der Überlebensanalyse im Kapitel 3.1.3 ein größeres Sterberisiko bei einer Zunahme der Genexpression darstellten, zu beobachten. Die Korrelationsanalyse dieser Gene mit der Immunzellinfiltration wurde als Streudiagramm in der **Abbildung 18** dargestellt.

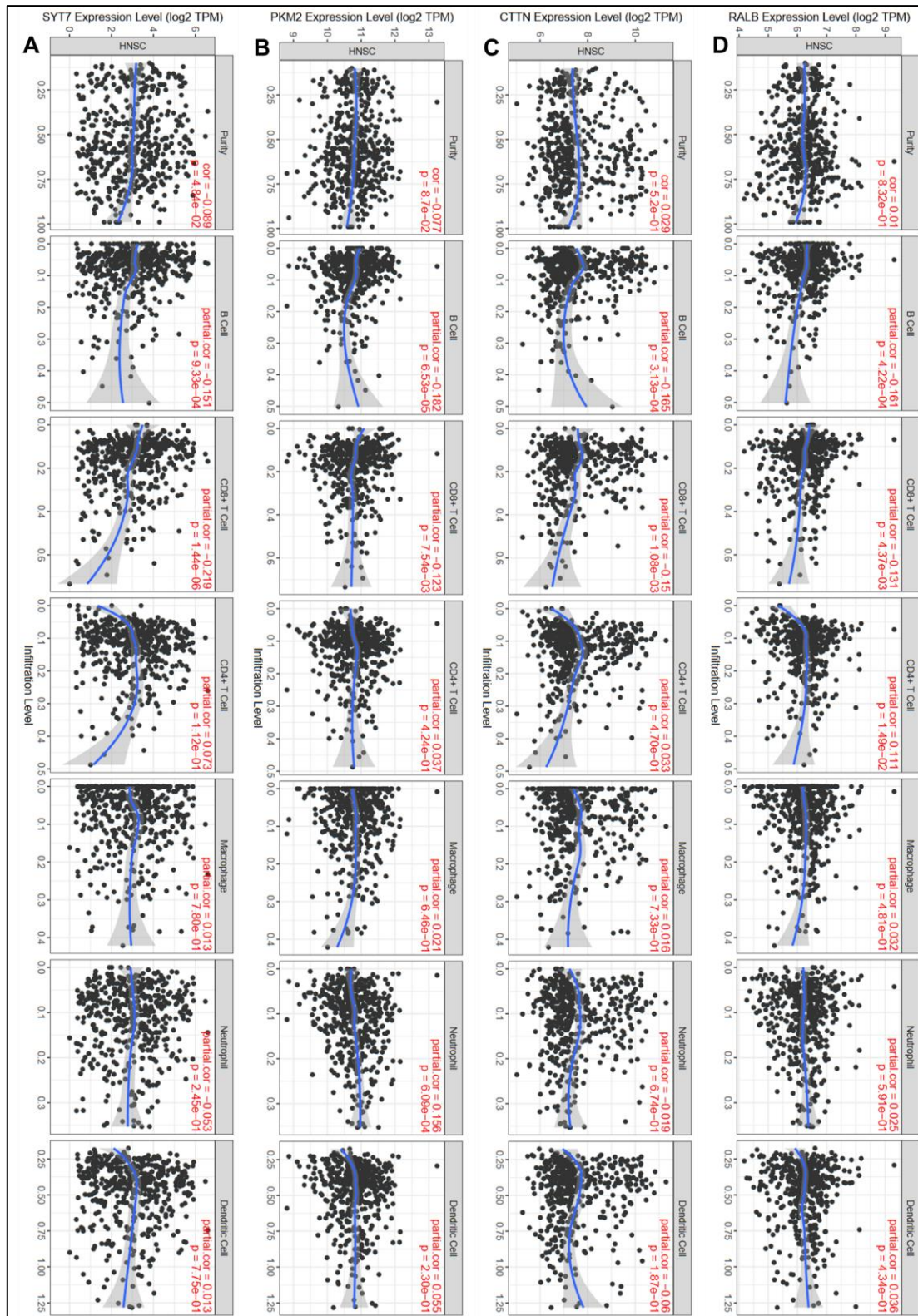


Abb. 18: Ergebnis der Korrelationsanalyse als Streudiagramm. Die Gene *SYT7*, *PKM2*, *CTTN* und *RALB* zeigten eine Tendenz zu einer erhöhten Infiltrationshäufigkeit von CD4(+) T-Zellen, Makrophagen, Neutrophilen und DCs sowie einer verminderten Infiltrationshäufigkeit von B-Zellen und CD8(+) T-Zellen. **(A)** *SYT7* **(B)** *PKM2* **(C)** *CTTN* **(D)** *RALB*

Die Korrelationsanalyse der Fathi-EVsig mit Tregs, MDSCs, Endothelzellen sowie CAFs in der **Abbildung 19** ergab, dass vor allem eine hohe Genexpression der Gene *RAB27A* und *SDC3* mit einer erhöhten Infiltrationshäufigkeit dieser Immunzell-Subtypen einherging.

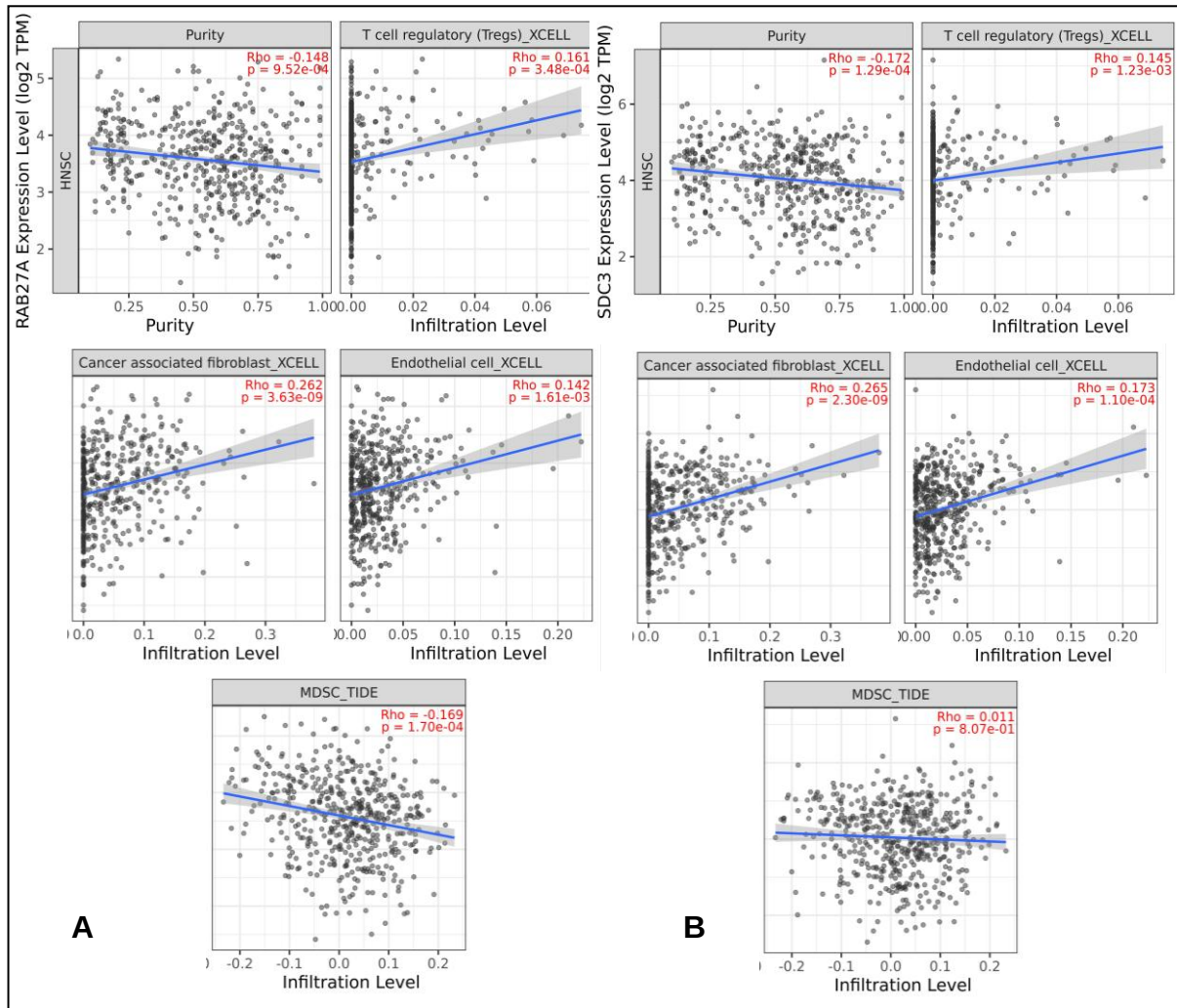


Abb. 19: Ergebnis der Korrelationsanalyse als Streudiagramm. Es zeigte eine positive Korrelation der Gene *RAB27A* und *SDC3* mit Tregs, CAFs und Endothelzellen. *RAB27A* korrelierte negativ mit MDSCs, während die Korrelation von *SDC3* mit MDSCs positiv war. **(A)** *RAB27A* **(B)** *SDC3*

3.4 Validierung der Ergebnisse mit der Hurwitz-EVsig

Da ungewiss ist, welche Gensignatur die Assoziation mit TEX am besten widerspiegelt, wurde eine zweite Gensignatur, die aus 25 Genen bestehende Hurwitz-EVsig (Hurwitz, Rider, et al., 2016), zur Validierung der bedeutsamsten Ergebnisse herangezogen. Diese Gensignatur wurde ebenso mit der Produktion von Exosomen in Verbindung gebracht.

3.4.1 Vergleich der Genexpression der Signatur im Tumor- und normalen soliden Gewebe

Die Genexpression der Hurwitz-EVsig war im HNSCC-Gewebe ebenso erhöht, erreichte jedoch keine statistisch signifikanten Unterschiede (siehe **Abbildung 20**).

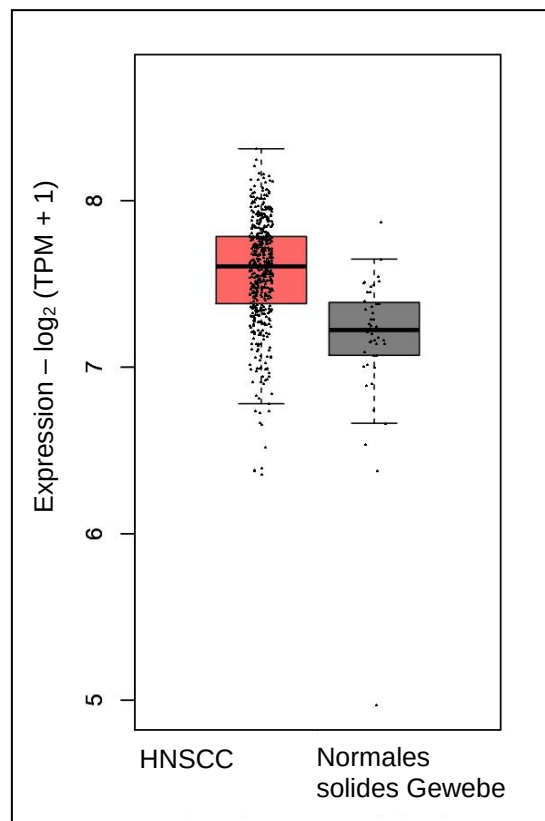


Abb. 20: Vergleich der Hurwitz-EVsig-Genexpression im normalen soliden Gewebe (n = 44) und im primären HNSCC (n = 519). Der hier dargestellte Box-Plot zeigt eine

erhöhte Genexpression der Hurwitz-EVsig im HNSCC. Die Daten wurden im Publikationsorgan *Clinical and Experimental Immunology* veröffentlicht.

Das Analyseergebnis in der **Abbildung 21** zeigt, dass 13 der 25 Gene der Hurwitz-EVsig im HNSCC hochreguliert waren, wohingegen die Expressionsniveaus von 10 Genen im HNSCC, verglichen mit normalen soliden Geweben, herunterreguliert waren. Die Gene *RAB5C* und *HRAS* wiesen keinen Expressionsunterschied auf.

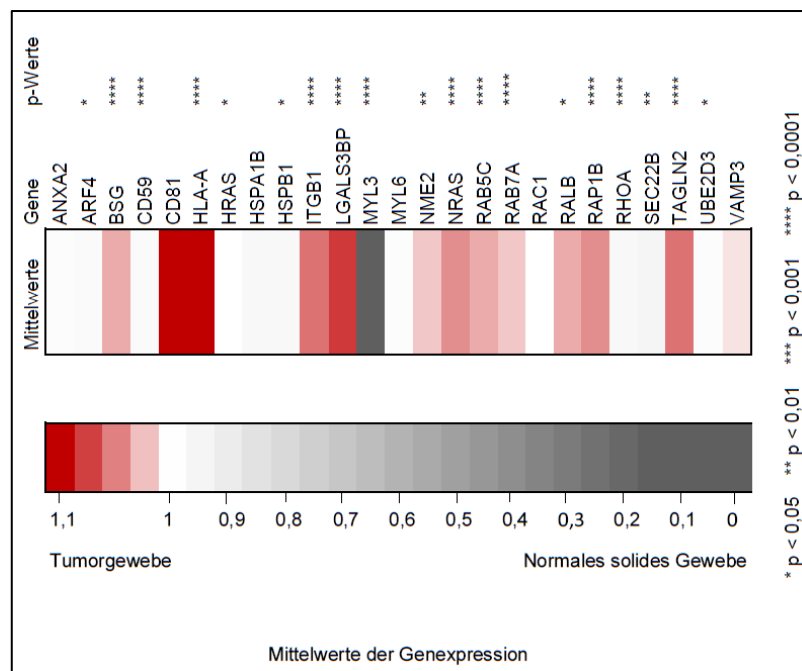


Abb. 21: Darstellung der Genexpressionswerte der Hurwitz-EVsig im normalen soliden Gewebe (n = 44) und im primären HNSCC (n = 564) als Heatmap. 13 Gene waren im HNSCC hochreguliert (rote Blöcke) und 10 Gene herunterreguliert (graue Blöcke). Die Daten wurden im Publikationsorgan *Clinical and Experimental Immunology* veröffentlicht.

3.4.2 Einfluss der Signatur auf die Überlebensprognose der Patienten

Die erstellte Heatmap in der **Abbildung 22** dient der allgemeinen Übersicht und zeigt, dass fast alle Gene der Hurwitz-EVsig bei einer hohen Genexpression zu einem schlechten Überleben beitrugen.

Drei Gene der Hurwitz-EVsig korrelierten statistisch signifikant negativ und ein Gen statistisch signifikant positiv mit dem medianen Gesamtüberleben von 200 Monaten. Bei gleichzeitiger Zunahme der Genexpression der drei Gene *NME*, *CD59* und *ANXA2* hatte die beobachtete Tumor-Patientengruppe ein größeres Sterberisiko.

Das Gen *HSPB1* stellte ein kleineres Sterberisiko für die beobachtete Tumor-Patientengruppe bei gleichzeitigem Anstieg der Genexpression dar.

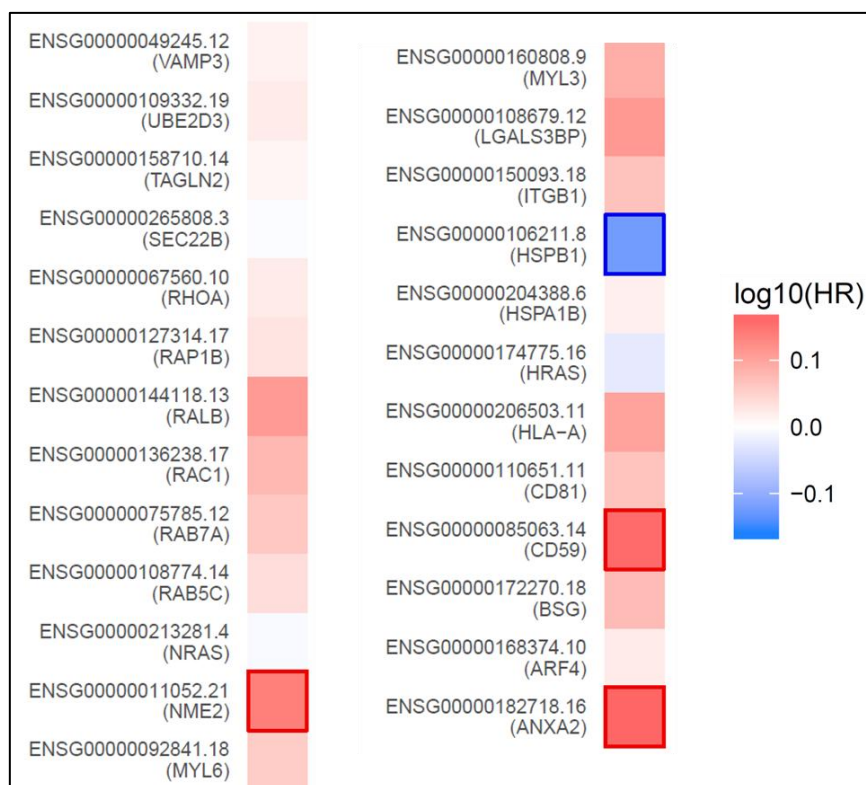


Abb. 22: Ergebnis der Korrelationsanalyse der Hurwitz-EVsig mit dem medianen Gesamtüberleben von 200 Monaten als Heatmap. Die roten Blöcke stellen ein größeres und die blauen Blöcke ein kleineres Sterberisiko bei der Zunahme der Genexpression dar. Dick umrandete Blöcke bedeuten, dass der p-Wert statistisch signifikant ist. Die Gene *NME*, *CD59* und *ANXA2* stellten ein größeres Sterberisiko dar, wohingegen das Gen *HSPB1* mit einem kleineren Sterberisiko bei gleichzeitigem Anstieg der Genexpression verbunden war.

Die Gene mit statistisch signifikantem p-Wert wurden wieder zusätzlich mithilfe des Tools TIMER2.0 untersucht und die Überlebenszeit auf 5 Jahre reduziert. Die generierten Kaplan-Meier-Überlebenskurven in der **Abbildung 23** bestätigten, dass

eine höhere Expression der Gene *NME2* ($p = 0,00143$) und *CD59* ($p = 0.0422$) signifikant mit einer schlechteren 5-Jahres-Überlebensrate verbunden war.

Die Gene *ANXA2* und *HSPB1* zeigten in der TIMER-Analyse keine statistische Signifikanz.

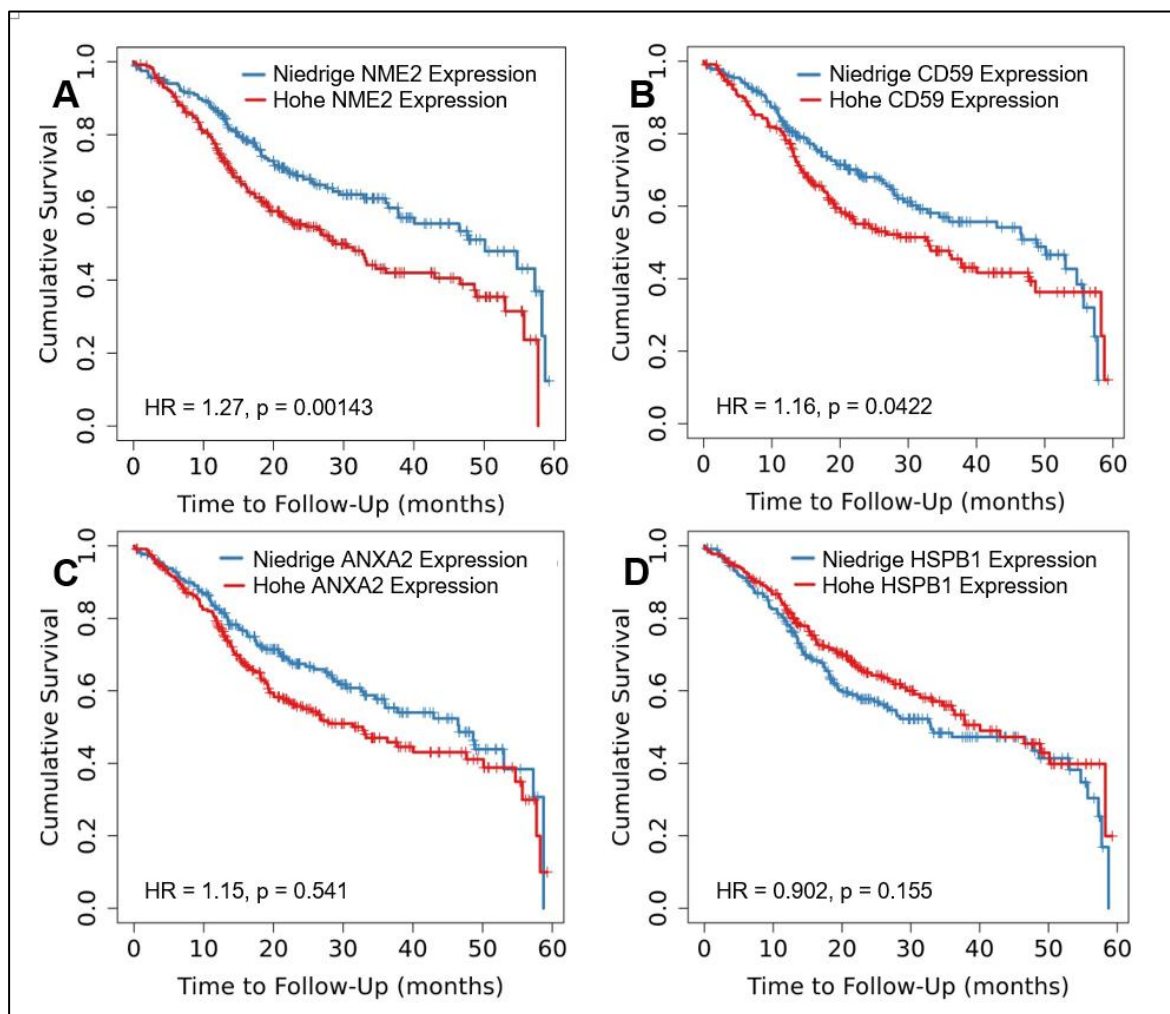


Abb. 23: Kaplan-Meier-Überlebenskurven einzelner Gene der Hurwitz-EVsig im HNSCC bei hoher Genexpression (rote Linie) im Vergleich zu niedriger Genexpression (blaue Linie). **(A)** *NME2* **(B)** *CD59* **(C)** *ANXA2* **(D)** *HSPB1*

Das Tool GEPIA2 ermöglichte eine gesamte Betrachtung der Hurwitz-EVsig und erstellte Kaplan-Meier-Überlebenskurven, die sich in der **Abbildung 24** befinden. Es stellte sich heraus, dass eine erhöhte Expression der Hurwitz-EVsig nicht signifikant mit einem schlechteren Gesamtüberleben der Patienten verbunden war. Für die Hurwitz-EVsig war ein signifikanter Einfluss auf das progressionsfreie Überleben

nachweisbar ($p = 0,032$). Eine erhöhte Expression der Hurwitz-EVsig war mit einem schlechteren progressionsfreien Überleben verbunden.

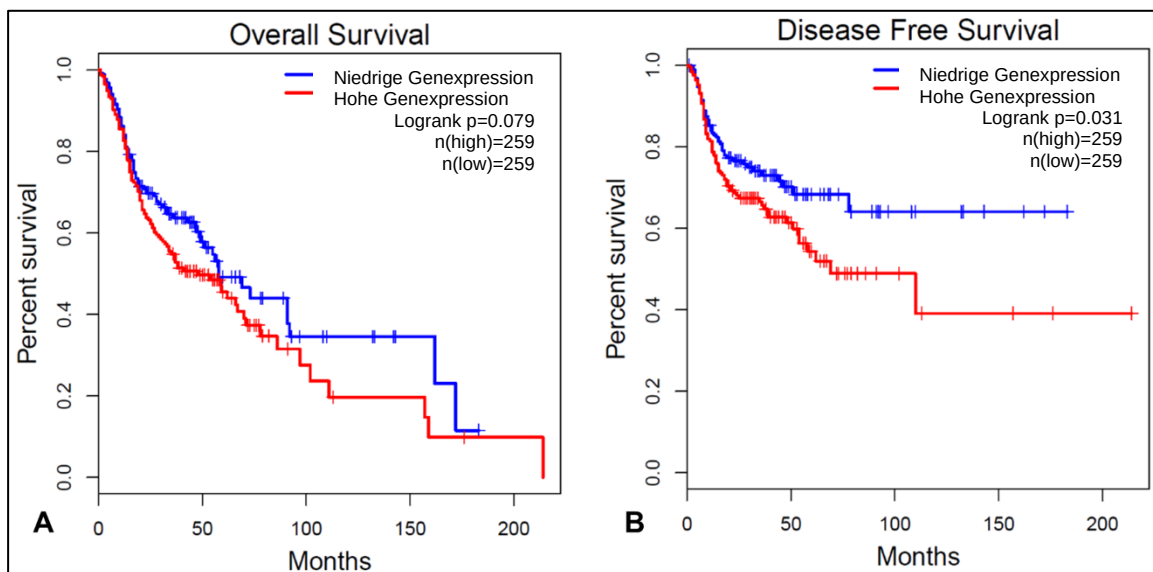


Abb. 24: Analyse der Genexpression der Hurwitz-EVsig bei HNSCC-Patienten und dessen Auswirkungen auf das Überleben der Patienten. **(A)** Kaplan-Meier-Gesamtüberlebenskurve der Hurwitz-EVsig bei hoher Genexpression (rote Linie) im Vergleich zu niedriger Genexpression (blaue Linie). Eine erhöhte Genexpression der Hurwitz-EVsig war nicht signifikant mit einem schlechteren Gesamtüberleben der Patienten verbunden. **(B)** Kaplan-Meier-Kurve für das progressionsfreie Überleben von Patienten bei hoher Genexpression (rote Linie) der Hurwitz-EVsig im Vergleich zu niedriger Genexpression (blaue Linie). Eine hohe Genexpression war signifikant mit einem schlechteren progressionsfreien Überleben verbunden. Die Daten wurden im Publikationsorgan *Clinical and Experimental Immunology* veröffentlicht.

3.4.3 Einfluss der Signatur auf die Immunlandschaft

Interessanterweise wurde auch bei der Hurwitz-EVsig beobachtet, dass erhöhte Expressionsniveaus der Gensignatur mit einer erhöhten Infiltrationshäufigkeit von tumorinfiltrierenden CD4(+) T-Zellen, Makrophagen, Neutrophilen und DCs ($p < 0,01$) und dem Ausschluss von B-Zellen und CD8(+) T-Zellen ($p < 0,01$) einhergingen. Endothelzellen und CAFs wurden im Tumorgewebe hochreguliert.

Die Immunlandschaft der Hurwitz-EVsig, die in der **Abbildung 25** dargestellt wurde, war dem Immunprofil der Fathi-EVsig sehr ähnlich.

Insgesamt deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass eine erhöhte Expression von Genen, die mit der Produktion von extrazellulären Vesikeln im Zusammenhang stehen, mit einer charakteristischen Landschaft tumorinfiltrierender Immunzellen verbunden ist, in der die Immuneffektorzellen verarmt sind.

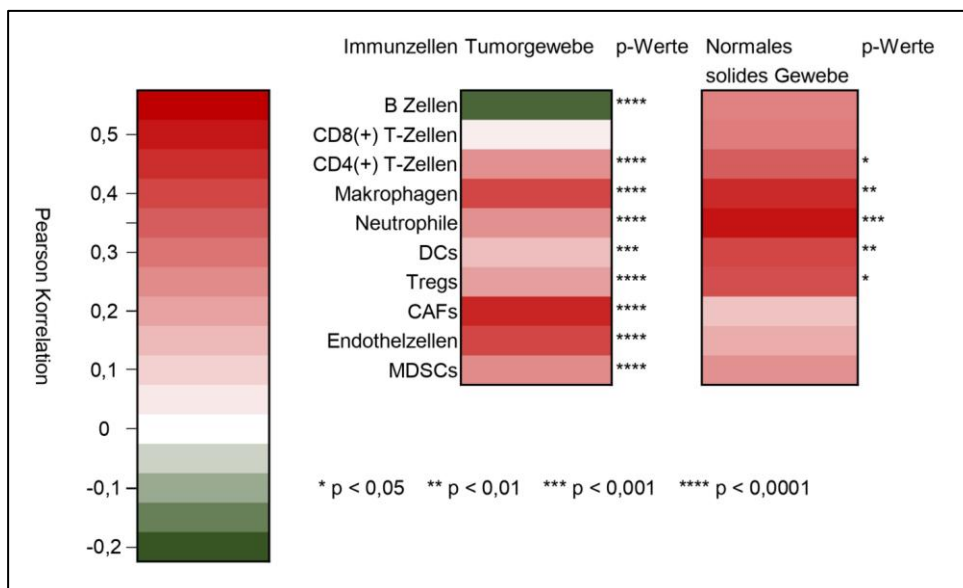


Abb 25: Ergebnis der Korrelationsanalyse der Immunzellinfiltration mit der Hurwitz-EVsig im Tumorgewebe und normalen soliden Gewebe als Heatmap. Endothelzellen und CAFs wurden im Tumorgewebe hochreguliert. Die Gensignatur war mit einem Ausschluss von B-Zellen und CD8(+) T-Zellen bei der Zunahme der Genexpression verbunden.

4 Diskussion

Die Schlüsselrolle der interzellulären Kommunikation innerhalb der TMU hat sich als Hauptmechanismus für die Tumorprogression herauskristallisiert und das Verständnis der Wechselwirkungen zwischen verschiedenen Immun- und Gewebezellen ist zu einem zentralen Ziel der Krebsforschung geworden. Seit vielen Jahrzehnten werden lösliche Faktoren, darunter Zytokine und Chemokine, für die Regulierung des zellulären Milieus in gesunden und pathologischen Geweben verantwortlich gemacht. Die Anerkennung extrazellulärer Vesikel als Teilnehmer des interzellulären Kommunikationsnetzwerks erfolgte jedoch erst vor wenigen Jahren. Seitdem sind TEX und extrazelluläre Vesikel, die von Immunzellen und Nicht-Immunzellen produziert werden und sich in der TMU befinden zu einem Gegenstand intensiven Interesses geworden und zahlreiche Studien, die ihre Rolle bei der Gestaltung von angeborenen und adaptiven Immunantworten bei Krebs untersuchen, sind im Gange (Whiteside, 2021).

In dieser Arbeit und auch in anderen Studien wurde gezeigt, dass von HNSCCs stammende extrazelluläre Vesikel eine Fracht biologisch aktiver Komponenten tragen und dass die Abgabe der Frachtkomponenten zu einer Umprogrammierung von tumorumgebenden und tumorinfiltrierenden Zellen führt (Whiteside et al., 2021; Azambuja, Ludwig, Yerneni, Braganhol, et al., 2020; Azambuja, Ludwig, Yerneni, Rao, et al., 2020). Obwohl von HNSCCs stammende extrazelluläre Vesikel bei der Vermittlung der Krebsprogression eine Rolle spielen (Jablonska et al., 2022), konnte ihr tatsächlicher Beitrag zur Bildung der tumorfördernden TMU noch nicht geklärt werden.

Um diesen Aspekt anzugehen, wurde für diese Arbeit zunächst nach Gensignaturen gesucht, die mit der Produktion von extrazellulären Vesikeln durch Tumorzellen im Zusammenhang stehen. Die verfügbaren Daten wurden in HNSCC-Proben bei hohen und niedrigen Produktionsraten von extrazellulären Vesikeln verglichen.

Da die TMU aus einer Vielzahl von zellulären Komponenten besteht, konnte in dieser Arbeit nur die Gesamtexpression von Genen analysiert werden und nicht die

Genexpression selektiv in Tumorzellen. Dies könnte ein Störfaktor in dieser Arbeit sein, da mehrere tumorassoziierte Zellen nachweislich extrazelluläre Vesikel sezernieren und generell fast alle Zelltypen unter gesunden oder pathologischen Bedingungen extrazelluläre Vesikel freisetzen (Azambuja, Ludwig, Yerneni, Braganhol, et al., 2020; Atay & Godwin, 2014).

In dem Artikel von Couch et al. wurde die Schwierigkeit, zuverlässige Marker für verschiedene Subtypen von extrazellulären Vesikeln zu generieren, beschrieben. Mehrere Labore haben gezeigt, dass es verschiedene Subtypen von extrazellulären Vesikeln mit unterschiedlicher Fracht und unterschiedlichen Freisetzungsmechanismen und Funktionen geben kann (Couch et al., 2021). Diese Subtypen mit Hilfe von Protein-Markern oder Gensignaturen selektiv zu erfassen, ist nach wie vor eine Herausforderung auf dem Gebiet der Biologie von extrazellulären Vesikeln, sodass die beiden in dieser Arbeit verwendeten Gensignaturen möglicherweise nicht die Komplexität der Biogenese und die Heterogenität von extrazellulären Vesikeln widerspiegeln.

Obwohl die Fathi-EVsig und die Hurwitz-EVsig nur zwei Gene gemeinsam haben und daher größtenteils unabhängige Signaturen sind, ergaben sich ähnliche Ergebnisse. Diese Ergebnisse deuten auf einen Beitrag der extrazellulären Vesikel zur Gestaltung der TMU und zur Förderung einer spezifischen Immunzelllandschaft beim HNSCC hin. Dies könnte bedeuten, dass die spezifische Gestaltung der Immunsituation ein übergreifender Mechanismus ist, der auf extrazelluläre Vesikel, die vom Tumor stammen, zurückgeführt werden kann.

In dieser Arbeit zeigte sich, dass eine erhöhte Expression von Genen, die mit der Produktion von extrazellulären Vesikeln im Zusammenhang stehen, mit einem Profil von TGFβ- und adenosinergen Signalwegen im Tumor korrelierte (siehe **Abbildung 9**). Von beiden Signalwegen ist bekannt, dass sie im HNSCC stark immunsuppressiv wirken und die Tumورprogression fördern (C. Wang et al., 2021; Ma et al., 2017; N. Ludwig et al., 2021; Deng et al., 2018). In einer Reihe neuerer Veröffentlichungen wurde die bedeutende Rolle extrazellulärer Vesikel als Träger und Produzenten von Adenosin hervorgehoben (Ploeg et al., 2021; M. Wang et al., 2021; Turiello et al., 2022). Es lässt sich schlussfolgern, dass TGFβ- und adenosinerge

Signalwege zu den bedeutendsten immunsuppressiven Mechanismen zählen könnten, die von TEX vermittelt werden.

Im Rahmen dieser Arbeit zeigte sich des Weiteren, dass eine hohe Expression von Genen, die mit der Produktion von extrazellulären Vesikeln im Zusammenhang stehen, mit einer Reihe von Zytokinen im HNSCC korrelierte. Es gab eine signifikante Korrelation mit IL-8 ($p < 0,0001$), das für die Rekrutierung von Immunzellen verantwortlich ist (Gauglitz et al., 2008), sowie mit IL-6 und IL-10 ($p < 0,01$), die die tumorfördernden Funktionen von Neutrophilen und Makrophagen vermitteln (Codony & Tavassoli, 2021; X. Zhang et al., 2016). Außerdem kann IL-10 auch CD8(+) T-Zellen beeinträchtigen (C. Wang et al., 2021). Die Beeinträchtigung der CD8(+) T-Zellen konnte ebenfalls in dieser Arbeit beobachtet werden, da die Häufigkeit der infiltrierenden CD8(+) T-Zellen im Tumorgewebe negativ mit der Genexpression der beiden untersuchten Gensignaturen korrelierte.

In der Literatur werden verschiedene Mechanismen für diese Unterdrückung der CD8(+) T-Zellen diskutiert. Eine mögliche Erklärung ist, dass die Interaktion zwischen dem Fas-Ligand (FasL), der von Entzündungszellen im Tumor ausgeschüttet wird, und dem Fas-Rezeptor die Apoptose von T-Zellen durch die Aktivierung einer Caspase-Kaskade ausgelöst wird (O'Brien et al., 2005). Ein weiterer Mechanismus, der in der Literatur beschrieben wird und zur Unterdrückung der T-Zell-Aktivität führt, beruht auf der Interaktion zwischen dem in Krebszellen und in TMU-Zellpopulationen vorkommenden Programmed-Death-Ligand 1 (PD-L1) und dem PD-1-Rezeptor, der auf aktivierten T-Zellen exprimiert wird. Studien zeigen, dass vor allem exosomales PD-L1 sich als zusätzlicher Toleranzmechanismus bei Krebs erwiesen hat (Daassi et al., 2020). Exosomen können das PD-L1-Protein auf Krebszellen und auf Zellen der TMU übertragen und diese von PD-L1-negativ in PD-L1-positiv umwandeln. Der von Yang et al. beobachtete Mechanismus deutet darauf hin, dass Exosomen die Immunsuppression in der TMU durch horizontalen Transfer des PD-L1-Proteins auf Zellen verstärken können (Y. Yang et al., 2018). Die Fathi-EVsig korrelierte ebenso positiv mit *CD274* (kodierend für PD-L1).

Darüber hinaus wies die Fathi-EVsig eine positive Korrelation mit Immun-Checkpoints wie CD276, PVR und c10orf54 auf, die durch ihre hemmenden Immunrezeptoren charakteristisch für eine immunsuppressive TMU sind (He & Xu, 2020).

Im Artikel von Wu et al. wird beschrieben, dass TEX sowohl immunsuppressive als auch immunstimulierende Rezeptoren/Liganden tragen und daher an verschiedenen immunmodulatorischen Pfaden beteiligt sein können (J. Wu et al., 2022). In den Artikeln von Whiteside und Labani-Motlagh et al. wird erklärt, dass die Fracht der TEX kostimulatorische Moleküle, Moleküle des Haupthistokompatibilitätskomplex der Klassen I und II, TAs und intraluminale wachstumsfördernde Zytokine sowie eine Fülle immuninhibitorischer Moleküle beinhaltet (Whiteside, 2017b; Labani-Motlagh et al., 2021). Analog zu diesen Artikeln konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Gensignatur, die mit der Produktion von extrazellulären Vesikeln im Zusammenhang steht, mit der Expression einer Vielzahl immunstimulierender Faktoren sowie tumorfördernder Faktoren, wie CXCL14, korreliert.

Unklar bleibt, wie die Übermittlung mehrerer Signale eine Stimulierung oder Hemmung der Immunantwort auslösen kann, worauf spezifische funktionelle Veränderungen in den Empfängerzellen folgen (Whiteside, 2017b).

Im Rahmen dieser Arbeit zeigte sich, dass die biologischen Gesamteffekte extrazellulärer Vesikel die Immunlandschaft in einer sehr spezifischen Weise formen. Diese Immunlandschaft geht mit dem Ausschluss von Effektor-Lymphozyten und der erhöhten Infiltrationshäufigkeit von CD4(+) T-Zellen, Makrophagen, Neutrophilen und DCs im HNSCC einher.

Derzeit wird untersucht, ob TEX eine unterschiedliche Rolle beim HPV-positiven und HPV-negativen HNSCC spielen. Studien deuten darauf hin, dass extrazelluläre Vesikel aus HPV-positiven und HPV-negativen HNSCCs unterschiedliche Proteingehalte aufweisen, die unterschiedliche funktionelle Effekte vermitteln. Dadurch könnten die unterschiedlichen Immunantworten, die HPV-positive und HPV-negative HNSCCs charakterisieren, erklärt werden (S. Ludwig et al., 2019). Im direkten Vergleich von extrazellulären Vesikeln, die aus viral- und karzinogen-induzierten HNSCCs isoliert wurden, waren HPV-positive extrazelluläre Vesikel in der Lage, dendritische

Zellfunktionen aufrechtzuerhalten. Sie könnten daher eine Rolle bei der Förderung von Anti-Tumor-Immunantworten bei Patienten mit einem HPV-positiven HNSCC spielen (S. Ludwig et al., 2018). Im Hinblick auf die Unterschiede zwischen HPV-positiven und HPV-negativen HNSCCs wurde in dieser Arbeit ähnliches beobachtet. Die Immunlandschaft war bei karzinogen- und viral-induzierten Primärtumoren unterschiedlich. Die Gene, die mit der Produktion von extrazellulären Vesikeln im Zusammenhang stehen, korrelierten im HPV-positiven HNSCC mit einer erhöhten Infiltrationshäufigkeit von Tregs und einer verringerten Infiltrationshäufigkeit von CD4(+) T-Zellen, CAFs und MDSCs im Gegensatz zu HPV-negativen HNSCC-Geweben. Diese Ergebnisse bedürfen einer weiteren Validierung in klinischen Tumorproben sowie in funktionellen *In-vitro*- und *In-vivo*-Studien und könnten das Verständnis der unterschiedlichen Immunlandschaft von viral- und karzinogen-induzierten HNSCCs beschleunigen.

Abschließend wurden die Forschungsfragen nochmal aufgegriffen und beantwortet.

1. Wie unterscheidet sich die Expression im Stroma- und Tumorgewebe?

Die Expression der Gene, die mit der Produktion von extrazellulären Vesikeln im Zusammenhang stehen, ist im Tumorgewebe hochreguliert.

2. Wie korreliert die Gensignatur mit der Überlebenswahrscheinlichkeit?

Für die Gene, die mit der Produktion von extrazellulären Vesikeln im Zusammenhang stehen, war kein signifikanter Einfluss auf das Gesamtüberleben nachweisbar. Es gab jedoch einen Trend, dass erhöhte Expressionsniveaus mit einem schlechten progressionsfreien Überleben verbunden waren.

3. Wie korreliert die Gensignatur mit der Immunzellinfiltration und gibt es Assoziationen mit immunmodulierenden Faktoren?

Die Expression der Gene, die mit der Produktion von extrazellulären Vesikeln im Zusammenhang stehen, ist mit einer spezifischen Immunlandschaft verbunden. Sie korreliert mit einer verminderten Infiltrationshäufigkeit von tumorinfiltrierenden Effektor-Lymphozyten. Es gibt Assoziationen mit den immunsuppressiven Marker *NT5E* und *TGFB1* in der TMU.

4. Welche Rolle spielen Mutationen im HNSCC?

Bei einer hohen Expression der Gene, die mit der Produktion von extrazellulären Vesikeln im Zusammenhang stehen, stellen Mutationen keinen einflussnehmenden Faktor im HNSCC dar.

5 Zusammenfassung

Plattenepithelkarzinome des Kopfes und Halses (HNSCCs) zeichnen sich durch ein immunsuppressives Milieu aus und entziehen sich der Immunantwort durch mehrere Resistenzmechanismen. Extrazelluläre Vesikel, die vom Tumor freigesetzt werden und mit Immunzellen interagieren, induzieren Immunstörungen und tragen zur Tumorprogression bei. Diese Arbeit evaluiert die klinische Relevanz und die Auswirkungen auf die Anti-Tumor-Immunantwort von Gensignaturen, die im HNSCC exprimiert werden und mit der Produktion von extrazellulären Vesikeln im Zusammenhang stehen. Die Expressionen von zwei kürzlich veröffentlichten Gensätzen wurden in der Kopf-Hals-Kohorte des Cancer Genome Atlas (TCGA) bestimmt. Insgesamt wurden 522 Fälle von primärem HNSCC in diese Arbeit aufgenommen und mit 44 normalen Kontrollen verglichen. Zur weiteren Analyse wurde ein Clustering in HPV(+) und HPV(-) Patienten durchgeführt. Es wurden 98 Fälle von HPV(+)-HNSCCs und 422 Fälle von HPV(-)-HNSCCs untersucht. Potenzielle Assoziationen zwischen Genexpressionsniveaus, Immunzellinfiltrationen und dem Gesamtüberleben (OS) wurden mit GEPIA2, TISIDB, TIMER, TIMER2.0 und dem UCSC Xena-Browser ermittelt. Im Vergleich zu normalen Kontrollgeweben waren Gene, die mit der Produktion von extrazellulären Vesikeln im Zusammenhang stehen in HNSCC-Geweben hochreguliert. Die Mehrheit der Gene im HPV(-)-HNSCC war mit einem schlechten Gesamtüberleben verbunden, wohingegen eine Prognose im HPV(+)-HNSCC besser war, wenn die Genexpressionen hoch waren. Die erhöhte Genexpression korrelierte positiv ($p < 0,01$) mit der erhöhten Anzahl von CD4(+) T-Zellen, Makrophagen, Neutrophilen und DCs, die das Tumorgewebe infiltrierten, war aber negativ ($p < 0,01$) mit dem Vorhandensein von B-Zellen und CD8(+) T-Zellen im Tumor verbunden. Dieser Ausschluss von Immunzellen war im HPV(+)-HNSCC stärker ausgeprägt als im HPV(-)-HNSCC ($p < 0,05$). Die Expressionsniveaus der immunsuppressiven Faktoren *NT5E* und *TGFB1* korrelierten mit den Genen, die mit der Produktion von extrazellulären Vesikeln im Zusammenhang stehen. Diese Beobachtung könnte die Veränderungen der Anti-Tumor-Immunantwort erklären.

6 Literaturverzeichnis

- Antwerpes, F., Hoogerwerf, J., van den Höfel, N., Hamad, H., Fink, B., Ardit, Z., Geelhaar, S., Graf, Y., No, D., Paul, O., Klüting, K., Moharam, N., Nitsch, T., Blaschke, J., Slongo, A., Dorn, H., Offe, J., & Hircin, E. (2023). B-Lymphozyt. *DocCheck Flexikon*. <https://flexikon.doccheck.com/de/B-Lymphozyt>. Abgerufen am 25.03.2023.
- Antwerpes, F., Wedig, M. P., & Kuklinski, N. (2019). Gesamtüberleben. *DocCheck Flexikon*. <https://flexikon.doccheck.com/de/Gesamtüberleben>. Abgerufen am 25.03.2023.
- Antwerpes, F., Wedig, M. P., & Wodarz, G. (2019). SOLiD-Sequenzierung. *DocCheck Flexikon*. <https://flexikon.doccheck.com/de/SOLiD-Sequenzierung>. Abgerufen am 25.03.2023.
- Atay, S., & Godwin, A. K. (2014). Tumor-derived exosomes: A message delivery system for tumor progression. *Communicative & Integrative Biology*, 7(1), Nr. e28231.
- Azambuja, J. H., Ludwig, N., Yerneni, S., Rao, A., Braganhol, E., & Whiteside, T. L. (2020). Molecular profiles and immunomodulatory activities of glioblastoma-derived exosomes. *Neuro-Oncology Advances*, 2(1), Nr. vdaa056.
- Azambuja, J. H., Ludwig, N., Yerneni, S. S., Braganhol, E., & Whiteside, T. L. (2020). Arginase-1+ Exosomes from Reprogrammed Macrophages Promote Glioblastoma Progression. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(11), Nr. 3990.
- Bayati, F., Mohammadi, M., Valadi, M., Jamshidi, S., Foma, A. M., & Sharif-Paghaleh, E. (2021). The Therapeutic Potential of Regulatory T Cells: Challenges and Opportunities. *Frontiers in Immunology*, 11, Nr. 585819.
- Behjati, S., & Tarpey, P. S. (2013). What is next generation sequencing? *Archives of Disease in Childhood: Education and Practice Edition*, 98(6), S. 236-238.
- Bosetti, C., Gallus, S., Trichopoulou, A., Talamini, R., Franceschi, S., Negri, E., & La Vecchia, C. (2003). Influence of the Mediterranean Diet on the Risk of Cancers of the Upper Aerodigestive Tract. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*, 12(10), S. 1091-1094.
- Boussiotis, V. A. (2016). Molecular and Biochemical Aspects of the PD-1 Checkpoint

- Pathway. *New England Journal of Medicine*, 375(18), S. 1767-1778.
- Caudell, J. J., Gillison, M. L., Maghami, E., Spencer, S., Pfister, D. G., Adkins, D., Birkeland, A. C., Brizel, D. M., Busse, P. M., Cmelak, A. J., Colevas, A. D., Eisele, D. W., Galloway, T., Geiger, J. L., Haddad, R. I., Hicks, W. L., Hitchcock, Y. J., Jimeno, A., Leizman, D., ... Darlow, S. D. (2022). NCCN Guidelines® Insights: Head and Neck Cancers, Version 1.2022. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network*, 20(3), S. 224–234.
- Chen, Y.-J., Chang, J. T.-C., Liao, C.-T., Wang, H.-M., Yen, T.-C., Chiu, C.-C., Lu, Y.-C., Li, H.-F., & Cheng, A.-J. (2008). Head and neck cancer in the betel quid chewing area: Recent advances in molecular carcinogenesis. *Cancer Science*, 99(8), S. 1507-1514.
- Chin, D., Boyle, G. M., Porceddu, S., Theile, D. R., Parsons, P. G., & Coman, W. B. (2006). Head and neck cancer: Past, present and future. *Expert Review of Anticancer Therapy*, 6(7), S. 1111-1118.
- Chow, L. Q. M. (2020). Head and neck cancer. *The New England Journal of Medicine*, 382(1), S. 60-72.
- Cillo, A. R., Kürten, C. H. L., Tabib, T., Qi, Z., Onkar, S., Wang, T., Liu, A., Duvvuri, U., Kim, S., Soose, R. J., Oesterreich, S., Chen, W., Lafyatis, R., Bruno, T. C., Ferris, R. L., & Vignali, D. A. A. (2020). Immune Landscape of Viral- and Carcinogen-Driven Head and Neck Cancer. *Immunity*, 52(1), S. 173-199.e9.
- Cocucci, E., & Meldolesi, J. (2015). Ectosomes and exosomes: shedding the confusion between extracellular vesicles. *Trends in Cell Biology*, 25(6), S. 364-372.
- Codony, V. L., & Tavassoli, M. (2021). Hypoxia-induced therapy resistance: Available hypoxia-targeting strategies and current advances in head and neck cancer. *Translational Oncology*, 14(3), Nr. 101017.
- Coordes, A., Lenz, K., Qian, X., Lenarz, M., Kaufmann, A. M., & Albers, A. E. (2016). Meta-analysis of survival in patients with HNSCC discriminates risk depending on combined HPV and p16 status. *European Archives of Oto-Rhino-Laryngology*, 273(8), S. 2157-2169.
- Couch, Y., Buzàs, E. I., Di Vizio, D., Gho, Y. S., Harrison, P., Hill, A. F., Lötvall, J., Raposo, G., Stahl, P. D., Théry, C., Witwer, K. W., & Carter, D. R. F. (2021). A brief history of nearly EV-erything – The rise and rise of extracellular vesicles. *Journal of Extracellular Vesicles*, 10(14), Nr. e12144.
- Craig, T. J., Anderson, D., Evans, A. J., Girach, F., & Henley, J. M. (2015).

- SUMOylation of Syntaxin1A regulates presynaptic endocytosis. *Scientific Reports*, 5(12), Nr. 17669.
- Daassi, D., Mahoney, K. M., & Freeman, G. J. (2020). The importance of exosomal PDL1 in tumour immune evasion. *Nature Reviews Immunology*, 20(4), S. 209-215.
- Davis, R. J., Van Waes, C., & Allen, C. T. (2016). Overcoming barriers to effective immunotherapy: MDSCs, TAMs, and Tregs as mediators of the immunosuppressive microenvironment in head and neck cancer. *Oral Oncology*, 58(7), S. 59-70.
- De Meulenaere, A., Vermassen, T., Aspeslagh, S., Vandecasteele, K., Rottey, S., & Ferdinande, L. (2017). TILs in Head and Neck Cancer: Ready for Clinical Implementation and Why (Not)? *Head and Neck Pathology*, 11(3), S. 354-363.
- Deng, W. W., Li, Y. C., Ma, S. R., Mao, L., Yu, G. T., Bu, L. L., Kulkarni, A. B., Zhang, W. F., & Sun, Z. J. (2018). Specific blockade CD73 alters the “exhausted” phenotype of T cells in head and neck squamous cell carcinoma. *International Journal of Cancer*, 143(6), S. 1494–1504.
- Denzer, K., Kleijmeer, M. J., Heijnen, H. F. G., Stoorvogel, W., & Geuze, H. J. (2000). Exosome: From internal vesicle of the multivesicular body to intercellular signaling device. *Journal of Cell Science*, 113(19), S. 3365-3374.
- Eldh, M., Ekström, K., Valadi, H., Sjöstrand, M., Olsson, B., Jernås, M., & Lötval, J. (2010). Exosomes Communicate Protective Messages during Oxidative Stress; Possible Role of Exosomal Shuttle RNA. *PLOS ONE*, 5(12), Nr. e15353.
- Engelhard, V., Conejo-Garcia, J. R., Ahmed, R., Nelson, B. H., Willard-Gallo, K., Bruno, T. C., & Fridman, W. H. (2021). B cells and cancer. *Cancer Cell*, 39(10), 1293–1296.
- Erdmann, F., Spix, C., Katalinic, A., Christ, M., Folkerts, J., Hansmann, J., Kranzhöfer, K., Kunz, B., Manegold, K., Penzkofer, A., Treml, K., Vollmer, G., Susanne, W.-R., Barnes, B., Buttman-Schweiger, N., Dahm, S., Fiebig, J., Franke, M., Schönfeld, I., ... Wienecke, A. (2021). Krebs in Deutschland für 2017/2018 (13.Aufl.), S. 1-168. Robert Koch-Institut und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V.
- Fathi, M., Joseph, R., Adolacion, J. R. T., Martinez-Paniagua, M., An, X., Gabrusiewicz, K., Mani, S. A., & Varadarajan, N. (2021). Single-cell cloning of breast cancer cells secreting specific subsets of extracellular vesicles. *Cancers*,

13(17), Nr. 4397.

- Filipazzi, P., Bürdek, M., Villa, A., Rivoltini, L., & Huber, V. (2012). Recent advances on the role of tumor exosomes in immunosuppression and disease progression. *Seminars in Cancer Biology*, 22(4), S. 342-349.
- Finotello, F., & Trajanoski, Z. (2018). Quantifying tumor-infiltrating immune cells from transcriptomics data. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 67(7), S. 1031-1040.
- Gauglitz, G. G., Finnerty, C. C., Herndon, D. N., Mlcak, R. P., & Jeschke, M. G. (2008). Are serum cytokines early predictors for the outcome of burn patients with inhalation injuries who do not survive? *Critical Care*, 12(3), Nr. R81.
- Gerhard, G. M., Bill, R., Messemaker, M., Klein, A. M., & Pittet, M. J. (2021). Tumor-infiltrating dendritic cell states are conserved across solid human cancers. *Journal of Experimental Medicine*, 218(1), Nr. e20200264.
- Goldman, M. J., Craft, B., Hastie, M., Repečka, K., McDade, F., Kamath, A., Banerjee, A., Luo, Y., Rogers, D., Brooks, A. N., Zhu, J., & Haussler, D. (2020). Visualizing and interpreting cancer genomics data via the Xena platform. *Nature Biotechnology*, 38(6), S. 675-678.
- Gowhari Shabgah, A., Haleem Al-qaim, Z., Markov, A., Valerievich Yumashev, A., Ezzatifar, F., Ahmadi, M., Mohammad Gheibihayat, S., & Gholizadeh Navashenaq, J. (2021). Chemokine CXCL14; a double-edged sword in cancer development. *International Immunopharmacology*, 97(12), Nr. 107681.
- Guillerey, C. (2020). NK Cells in the Tumor Microenvironment. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1273, S. 69–90.
- Guo, W., Gao, Y., Li, N., Shao, F., Wang, C., Wang, P., Yang, Z., Li, R., & He, J. (2017). Exosomes: New players in cancer (Review). *Oncology Reports*, 38(2), S. 665-675.
- Gupta, S. C., Kunnumakkara, A. B., Aggarwal, S., & Aggarwal, B. B. (2018). Inflammation, a Double-Edge Sword for Cancer and Other Age-Related Diseases. *Frontiers in Immunology*, 9, Nr. 2160.
- Gutiérrez-Vázquez, C., Villarroya-Beltri, C., Mittelbrunn, M., & Sánchez-Madrid, F. (2013). Transfer of extracellular vesicles during immune cell-cell interactions. *Immunological Reviews*, 251(1), S. 125-142.
- Haddad, B. R., Zimmet, S. C., & Clarke, R. (2017). GeorgetownX: Demystifying Biomedical Big Data: A User's Guide. EdX. <https://www.edx.org/learn/computer-programming/georgetown-university-demystifying-biomedical-big-data-a-users->

guide?index=product&objectID=course-63f8ec13-8c6b-4c70-b380-3f95e56a21f6&webview=false&campaign=Demystifying+Biomedical+Big+Data%253A+A+User%25E2. Abgerufen am 25.04.2021.

- He, X., & Xu, C. (2020). Immune checkpoint signaling and cancer immunotherapy. *Cell Research*, 30(8), S. 660-669.
- Hu, T., Chitnis, N., Monos, D., & Dinh, A. (2021). Next-generation sequencing technologies: An overview. *Human Immunology*, 82(11), S. 801-811.
- Hung, J.-H., & Weng, Z. (2017). Analysis of microarray and RNA-seq expression profiling data. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2017(3), S. 191–196.
- Hurwitz, S. N., Conlon, M. M., Rider, M. A., Brownstein, N. C., & Meckes, D. G. (2016). Nanoparticle analysis sheds budding insights into genetic drivers of extracellular vesicle biogenesis. *Journal of Extracellular Vesicles*, 5(1), Nr. 31295.
- Hurwitz, S. N., Rider, M. A., Bundy, J. L., Liu, X., Singh, R. K., & Meckes, D. G. (2016). Proteomic profiling of NCI-60 extracellular vesicles uncovers common protein cargo and cancer type-specific biomarkers. *Oncotarget*, 7(52), S. 86999-87015.
- Ishikawa, J., Kaisho, T., Tomizawa, H., Lee, B. O., Kobune, Y., Inazawa, J., Oritani, K., Itoh, M., Ochi, T., & Ishihara, K. (1995). Molecular cloning and chromosomal mapping of a bone marrow stromal cell surface gene, BST2, that may be involved in pre-B-cell growth. *Genomics*, 26(3), S. 527-534.
- Jablonska, J., Rist, M., Spyra, I., Tengler, L., Domnich, M., Kansy, B., Giebel, B., Thakur, B. K., Rotter, N., Lang, S., & Ludwig, S. (2022). Evaluation of Immunoregulatory Biomarkers on Plasma Small Extracellular Vesicles for Disease Progression and Early Therapeutic Response in Head and Neck Cancer. *Cells*, 11(5), Nr. 902.
- Johnson, D. E., Burtneß, B., Leemans, C. R., Lui, V. W. Y., Bauman, J. E., & Grandis, J. R. (2020). Head and neck squamous cell carcinoma. *Nature Reviews Disease Primers*, 6(1), Nr. 92.
- Kallinger, I., Rubenich, D. S., Głuszko, A., Kulkarni, A., Spanier, G., Spoerl, S., Taxis, J., Poeck, H., Szczepański, M. J., Ettl, T., Reichert, T. E., Meier, J. K., Braganhol, E., Ferris, R. L., Whiteside, T. L., & Ludwig, N. (2023). Tumor gene signatures that correlate with release of extracellular vesicles shape the immune landscape in head and neck squamous cell carcinoma. *Clinical and Experimental Immunology*, 213(1), S. 102–113
- Karnezis, T., Farnsworth, R. H., Harris, N. C., Williams, S. P., Caesar, C., Byrne, D. J.,

- Herle, P., Macheda, M. L., Shayan, R., Zhang, Y.-F., Yazar, S., Takouridis, S. J., Gerard, C., Fox, S. B., Achen, M. G., & Stacker, S. A. (2019). CCL27/CCL28-CCR10 chemokine signaling mediates migration of lymphatic endothelial cells. *Cancer Research*, 79(7), S. 1558-1572.
- Ko, S. Y., Lee, W., Kenny, H. A., Dang, L. H., Ellis, L. M., Jonasch, E., Lengyel, E., & Naora, H. (2019). Cancer-derived small extracellular vesicles promote angiogenesis by heparin-bound, bevacizumab-insensitive VEGF, independent of vesicle uptake. *Communications Biology*, 2, Nr. 386.
- Labani-Motlagh, A., Naseri, S., Wenthe, J., Eriksson, E., & Loskog, A. (2021). Systemic immunity upon local oncolytic virotherapy armed with immunostimulatory genes may be supported by tumor-derived exosomes. *Molecular Therapy - Oncolytics*, 20(3), S. 508-518.
- Lawrence, M. S., Sougnez, C., Lichtenstein, L., Cibulskis, K., Lander, E., Gabriel, S. B., Getz, G., Ally, A., Balasundaram, M., Birol, I., Bowlby, R., Brooks, D., Butterfield, Y. S. N., Carlsen, R., Cheng, D., Chu, A., Dhalla, N., Guin, R., Holt, R. A., ... Pham, M. (2015). Comprehensive genomic characterization of head and neck squamous cell carcinomas. *Nature*, 517(7536), S. 576-582.
- Leemans, C. R., Braakhuis, B. J. M., & Brakenhoff, R. H. (2011). The molecular biology of head and neck cancer. *Nature Reviews Cancer*, 11(1), S. 9-22.
- Li, M., Zeringer, E., Barta, T., Schageman, J., Cheng, A., & Vlassov, A. V. (2014). Analysis of the RNA content of the exosomes derived from blood serum and urine and its potential as biomarkers. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 369(1652), Nr. 20130502.
- Li, T., Fu, J., Zeng, Z., Cohen, D., Li, J., Chen, Q., Li, B., & Liu, X. S. (2020). TIMER2.0 for analysis of tumor-infiltrating immune cells. *Nucleic Acids Research*, 48(W1), S. W509-W514.
- Liu, S., Galat, V., Galat, Y., Lee, Y. K. A., Wainwright, D., & Wu, J. (2021). NK cell-based cancer immunotherapy: from basic biology to clinical development. *Journal of Hematology and Oncology*, 14(1), Nr. 7.
- Long, K., Cai, L., & He, L. (2018). DNA Sequencing Data Analysis. In: Huang, T. (Hrsg.), *Computational Systems Biology - Methods and Protocols* (Bd 1754, 1. Aufl.). S. 1-13. Humana Press.
- Lorenc, T., Klimczyk, K., Michalczywska, I., Słomka, M., Kubiak-Tomaszewska, G., & Olejarsz, W. (2020). Exosomes in Prostate Cancer Diagnosis, Prognosis and

- Therapy. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(6), Nr. 2118.
- Ludwig, N., Rao, A., Sandlesh, P., Yerneni, S. S., Swain, A. D., Bullock, K. M., Hansen, K. M., Zhang, X., Jaman, E., Allen, J., Krueger, K., Hong, C.-S., Banks, W. A., Whiteside, T. L., & Amankulor, N. M. (2022). Characterization of systemic immunosuppression by IDH mutant glioma small extracellular vesicles. *Neuro-Oncology*, 24(2), S. 197-209.
- Ludwig, N., Wieteska, Ł., Hinck, C. S., Yerneni, S. S., Azambuja, J. H., Bauer, R. J., Reichert, T. E., Hinck, A. P., & Whiteside, T. L. (2021). Novel TGF β Inhibitors Ameliorate Oral Squamous Cell Carcinoma Progression and Improve the Antitumor Immune Response of Anti-PD-L1 Immunotherapy. *Molecular Cancer Therapeutics*, 20(6), S. 1102-1111.
- Ludwig, N., Yerneni, S. S., Azambuja, J. H., Pietrowska, M., Widłak, P., Hinck, C. S., Głuszko, A., Szczepański, M. J., Kärmer, T., Kallinger, I., Schulz, D., Bauer, R. J., Spanier, G., Spoerl, S., Meier, J. K., Ettl, T., Razzo, B. M., Reichert, T. E., Hinck, A. P., & Whiteside, T. L. (2022). TGF β ⁺ small extracellular vesicles from head and neck squamous cell carcinoma cells reprogram macrophages towards a pro-angiogenic phenotype. *Journal of Extracellular Vesicles*, 11(12), Nr. e12294.
- Ludwig, N., Yerneni, S. S., Razzo, B. M., & Whiteside, T. L. (2018). Exosomes from HNSCC promote angiogenesis through reprogramming of endothelial cells. *Molecular Cancer Research*, 16(11), 1798–1808.
- Ludwig, S., Floros, T., Theodoraki, M. N., Hong, C. S., Jackson, E. K., Lang, S., & Whiteside, T. L. (2017). Suppression of lymphocyte functions by plasma exosomes correlates with disease activity in patients with head and neck cancer. *Clinical Cancer Research*, 23(16), S. 4843-4854.
- Ludwig, S., Marczak, L., Sharma, P., Abramowicz, A., Gawin, M., Widlak, P., Whiteside, T. L., & Pietrowska, M. (2019). Proteomes of exosomes from HPV(+) or HPV(-) head and neck cancer cells: differential enrichment in immunoregulatory proteins. *OncolImmunology*, 8(7), Nr. e1593808.
- Ludwig, S., Sharma, P., Theodoraki, M. N., Pietrowska, M., Yerneni, S. S., Lang, S., Ferrone, S., & Whiteside, T. L. (2018). Molecular and Functional Profiles of Exosomes From HPV(+) and HPV(-) Head and Neck Cancer Cell Lines. *Frontiers in Oncology*, 8, Nr. 445.
- Ma, S.-R., Deng, W.-W., Liu, J.-F., Mao, L., Yu, G.-T., Bu, L.-L., Kulkarni, A. B., Zhang, W.-F., & Sun, Z.-J. (2017). Blockade of adenosine A2A receptor enhances CD8+

- T cells response and decreases regulatory T cells in head and neck squamous cell carcinoma. *Molecular Cancer*, 16(1), Nr. 99.
- Machiels, J.-P., René Leemans, C., Golusinski, W., Grau, C., Licitra, L., & Gregoire, V. (2020). Squamous cell carcinoma of the oral cavity, larynx, oropharynx and hypopharynx: EHNS–ESMO–ESTRO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up†. *Annals of Oncology*, 31(11), S. 1462–1475.
- Mao, X., Xu, J., Wang, W., Liang, C., Hua, J., Liu, J., Zhang, B., Meng, Q., Yu, X., & Shi, S. (2021). Crosstalk between cancer-associated fibroblasts and immune cells in the tumor microenvironment: new findings and future perspectives. *Molecular Cancer*, 20(1), Nr. 131.
- Mardis, E. R. (2017). DNA sequencing technologies: 2006-2016. *Nature Protocols*, 12(2), S. 213-218.
- Mashouri, L., Yousefi, H., Aref, A. R., Ahadi, A. M., Molaei, F., & Alahari, S. K. (2019). Exosomes: Composition, biogenesis, and mechanisms in cancer metastasis and drug resistance. *Molecular Cancer*, 18(1), Nr. 75.
- Mathieu, M., Martin-Jaular, L., Grégory, L., & Théry, C. (2019). Specificities of secretion and uptake of exosomes and other extracellular vesicles for cell-to-cell communication. *Nature Cell Biology*, 21(1), S. 9-17.
- Mathivanan, S., Ji, H., & Simpson, R. J. (2010). Exosomes: Extracellular organelles important in intercellular communication. *Journal of Proteomics*, 73(10), S. 1907-1920.
- Maxam, A. M., & Gilbert, W. (1977). A new method for sequencing DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74(2), S. 560-564.
- Michaud, D. S., Langevin, S. M., Eliot, M., Nelson, H. H., Pawlita, M., McClean, M. D., & Kelsey, K. T. (2014). High-risk HPV types and head and neck cancer. *International Journal of Cancer*, 135(7), S. 1653-1661.
- Mirza, A. H., Thomas, G., Ottensmeier, C. H., & King, E. V. (2019). Importance of the immune system in head and neck cancer. *Head & Neck*, 41(8), S. 2789-2800.
- Murphy, K., & Weaver, C. (2017). T-cell-Mediated Immunity. In *Janeway's immunobiology* (9. Aufl.). S. 345-398. Garland Science/Taylor & Francis Group, LLC.
- Ng, M. S. F., Kwok, I., Tan, L., Shi, C., Cerezo-Wallis, D., Tan, Y., Leong, K., Calvo, G. F., Yang, K., Zhang, Y., Jin, J., Liong, K. H., Wu, D., He, R., Liu, D., Teh, Y. C.,

- Bleriot, C., Caronni, N., Liu, Z., ... Ng, L. G. (2024). Deterministic reprogramming of neutrophils within tumors. *Science*, 383(6679), Nr. 163.
- O'Brien, D. I., Nally, K., Kelly, R. G., M O'Connor, T., Shanahan, F., & O'Connell, J. (2005). Targeting the Fas / Fas ligand. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 9(5), S. 1031-1044.
- Odell, E., Kujan, O., Warnakulasuriya, S., & Sloan, P. (2021). Oral epithelial dysplasia: Recognition, grading and clinical significance. *Oral Diseases*, 27(8), S. 1947-1976.
- Pai, S. I., & Westra, W. H. (2009). Molecular Pathology of Head and Neck Cancer: Implications for Diagnosis, Prognosis, and Treatment. In *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 4, S. 49-70.
- Pareek, C. S., Smoczynski, R., & Tretyn, A. (2011). Sequencing technologies and genome sequencing. *Journal of Applied Genetics*, 52(4), S. 413-435.
- Parikh, A., Shin, J. H., Faquin, W., Lin, D. T., Tirosh, I., Sunwoo, J. B., & Puram, S. V. (2020). Malignant cell-specific CXCL14 promotes tumor lymphocyte infiltration in oral cavity squamous cell carcinoma. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*, 8(2), Nr. e001048.
- Peltanova, B., Raudenska, M., & Masarik, M. (2019). Effect of tumor microenvironment on pathogenesis of the head and neck squamous cell carcinoma: A systematic review. *Molecular Cancer*, 18(1), Nr. 63.
- Pitt, J. M., André, F., Amigorena, S., Soria, J.-C., Eggermont, A., Kroemer, G., & Zitvogel, L. (2016). Dendritic cell-derived exosomes for cancer therapy. *Journal of Clinical Investigation*, 126(4), S. 1224-1232.
- Ploeg, E. M., Ke, X., Britsch, I., Hendriks, M. A. J. M., Van der Zant, F. A., Kruijff, S., Samplonius, D. F., Zhang, H., & Helfrich, W. (2021). Bispecific antibody CD73xEpCAM selectively inhibits the adenosine-mediated immunosuppressive activity of carcinoma-derived extracellular vesicles. *Cancer Letters*, 521, S. 109-118.
- Prager, I., & Watzl, C. (2019). Mechanisms of natural killer cell-mediated cellular cytotoxicity. *Journal of Leukocyte Biology*, 105(6), S. 1319-1329.
- Reichert, T. E., Strauss, L., Wagner, E. M., Gooding, W., & Whiteside, T. L. (2002). Signaling Abnormalities, Apoptosis, and Reduced Proliferation of Circulating and Tumor-infiltrating Lymphocytes in Patients with Oral Carcinoma. *Clinical Cancer Research*, 8(10), S. 3137-3145.

- Reiners, K. S., Dassler-Plenker, J., Coch, C., & Hartmann, G. (2017). Funktion von extrazellulären Vesikeln und Bedeutung für die labormedizinische Diagnostik. *LaboratoriumsMedizin*, 41(6), S. 299-308.
- Robbins, P. D., & Morelli, A. E. (2014). Regulation of immune responses by extracellular vesicles. *Nature Reviews Immunology*, 14(3), S. 195-208.
- Ru, B., Wong, C. N., Tong, Y., Zhong, J. Y., Zhong, S. S. W., Wu, W. C., Chu, K. C., Wong, C. Y., Lau, C. Y., Chen, I., Chan, N. W., & Zhang, J. (2019). TISIDB: an integrated repository portal for tumor-immune system interactions. *Bioinformatics*, 35(20), S. 4200-4202.
- Ruffin, A. T., Li, H., Vujanovic, L., Zandberg, D. P., Ferris, R. L., & Bruno, T. C. (2023). Improving head and neck cancer therapies by immunomodulation of the tumour microenvironment. *Nature Reviews Cancer*, 23(3), S. 173–188.
- Sanger, F., Nicklen, S., & Coulson, A. . (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74(12), S. 5463-5467.
- Sedgwick, A. E., & D'Souza-Schorey, C. (2018). The biology of extracellular microvesicles. *Traffic*, 19(5), S. 319-327.
- Sharma, P., & Allison, J. P. (2015). The future of immune checkpoint therapy. *Science*, 348(6230), S. 56-61.
- Simpson, R. J., Kalra, H., & Mathivanan, S. (2012). Exocarta as a resource for exosomal research. *Journal of Extracellular Vesicles*, 1(1), Nr. 18374.
- Solomon, B., Young, R. J., & Rischin, D. (2018). Head and neck squamous cell carcinoma: Genomics and emerging biomarkers for immunomodulatory cancer treatments. *Seminars in Cancer Biology*, 52(2), S. 228-240.
- Stephen, J. K., Divine, G., Chen, K. M., Chitale, D., Havard, S., & Worsham, M. J. (2013). Significance of p16 in Site-specific HPV Positive and HPV Negative Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Cancer and Clinical Oncology*, 2(1), S. 51-61.
- Szklarczyk, D., Gable, A. L., Nastou, K. C., Lyon, D., Kirsch, R., Pyysalo, S., Doncheva, N. T., Legeay, M., Fang, T., Bork, P., Jensen, L. J., & von Mering, C. (2021). The STRING database in 2021: Customizable protein-protein networks, and functional characterization of user-uploaded gene/measurement sets. *Nucleic Acids Research*, 49(D1), S. D605-D612.
- Tang, Z., Kang, B., Li, C., Chen, T., & Zhang, Z. (2019). GEPIA2: an enhanced web

- server for large-scale expression profiling and interactive analysis. *Nucleic Acids Research*, 47(W1), S. W556-W560.
- Tapprich, W. E., Reichart, L., Simon, D. M., Duncan, G., McClung, W., Grandgenett, N., & Pauley, M. A. (2021). An instructional definition and assessment rubric for bioinformatics instruction. *Biochemistry and Molecular Biology Education*, 49(1), S. 38-45.
- Telloni, S. M. (2017). Tumor Staging and Grading: A Primer. *Methods in Molecular Biology*, 1606, S. 1-17.
- Togashi, Y., Shitara, K., & Nishikawa, H. (2019). Regulatory T cells in cancer immunosuppression - implications for anticancer therapy. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 16(6), S. 356-371.
- Tomczak, K., Czerwińska, P., & Wiznerowicz, M. (2015). The Cancer Genome Atlas (TCGA): An immeasurable source of knowledge. *Contemporary Oncology*, 19(1A), S. A68-A77.
- Turiello, R., Capone, M., Morretta, E., Monti, M. C., Madonna, G., Azzaro, R., Del Gaudio, P., Simeone, E., Sorrentino, A., Ascierto, P. A., & Morello, S. (2022). Exosomal CD73 from serum of patients with melanoma suppresses lymphocyte functions and is associated with therapy resistance to anti-PD-1 agents. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*, 10(3), Nr. e004043.
- Verma, M., Kulshrestha, S., & Puri, A. (2017). Genome Sequencing. *Methods in Molecular Biology*, 1525, S. 3-33.
- Villadangos, J. A., & Schnorrer, P. (2007). Intrinsic and cooperative antigen-presenting functions of dendritic-cell subsets in vivo. *Nature Reviews Immunology*, 7(7), S. 543-555.
- Wang, C., Li, Y., Jia, L., Kim, J. koo, Li, J., Deng, P., Zhang, W., Krebsbach, P. H., & Wang, C.-Y. (2021). CD276 expression enables squamous cell carcinoma stem cells to evade immune surveillance. *Cell Stem Cell*, 28(9), S. 1597-1613.e7.
- Wang, M., Jia, J., Cui, Y., Peng, Y., & Jiang, Y. (2021). CD73-positive extracellular vesicles promote glioblastoma immunosuppression by inhibiting T-cell clonal expansion. *Cell Death and Disease*, 12(11), Nr. 1065.
- Wang, Q., Shao, X., Zhang, Y., Zhu, M., Wang, F. X. C., Mu, J., Li, J., Yao, H., & Chen, K. (2023). Role of tumor microenvironment in cancer progression and therapeutic strategy. *Cancer Medicine*, 12(10), S. 11149-11165.
- Wang, Z., Chen, J.-Q., Liu, J.-L., & Tian, L. (2016). Exosomes in tumor

- microenvironment: novel transporters and biomarkers. *Journal of Translational Medicine*, 14, Nr. 297.
- Warde-Farley, D., Donaldson, S. L., Comes, O., Zuberi, K., Badrawi, R., Chao, P., Franz, M., Grouios, C., Kazi, F., Lopes, C. T., Maitland, A., Mostafavi, S., Montojo, J., Shao, Q., Wright, G., Bader, G. D., & Morris, Q. (2010). The GeneMANIA prediction server: Biological network integration for gene prioritization and predicting gene function. *Nucleic Acids Research*, 38(W1), S. W214-W220.
- Whiteside, T. L. (2010). Immune responses to malignancies. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 125(2, Ergänzung 2), S. S272-S283.
- Whiteside, T. L. (2016). Exosomes and tumor-mediated immune suppression. *Journal of Clinical Investigation*, 126(4), S. 1216-1223.
- Whiteside, T. L. (2017a). Exosomes carrying immunoinhibitory proteins and their role in cancer. *Clinical and Experimental Immunology*, 189(3), S. 259-267.
- Whiteside, T. L. (2017b). The effect of tumor-derived exosomes on immune regulation and cancer immunotherapy. *Future Oncology*, 13(28), S. 2583-2592.
- Whiteside, T. L. (2018a). Exosome and mesenchymal stem cell cross-talk in the tumor microenvironment. *Seminars in Immunology*, 35, S. 69-79.
- Whiteside, T. L. (2018b). The potential of tumor-derived exosomes for noninvasive cancer monitoring: an update. *Expert Review of Molecular Diagnostics*, 18(12), S. 1029-1040.
- Whiteside, T. L. (2021). The role of tumor-derived exosomes (Tex) in shaping anti-tumor immune competence. *Cells*, 10(11), Nr. 3054.
- Whiteside, T. L., Diergaarde, B., & Hong, C.-S. (2021). Tumor-Derived Exosomes (TEX) and Their Role in Immuno-Oncology. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(12), Nr. 6234.
- Wolff, K.-D., Al-Nawas, B., Al-Sharif, U., Beck, J., Bikowski, K., Bissinger, O., Böhme, P., Bönke-Hieronymus, I., Bootz, F., Bozzato, A., Budach, W., Burkhardt, A., Danker, H., Eberhardt, W., Engers, K., Fietkau, R., Frerich, B., Gauler, T., Gehrmann-Weide, K., ... Zöphel, K. (2021). S3-Leitlinie Diagnostik und Therapie des Mundhöhlenkarzinoms (Version 3.0). Leitlinienprogramm Onkologie der Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften (AWMF), Deutschen Krebsgesellschaft (DKG) und Deutschen Krebshilfe (DKH), AWMF Registernummer: 007/100OL. S. 1-157. Abgerufen am 05.02.2022.
- Wong, S. H. M., Fang, C. M., Chuah, L. H., Leong, C. O., & Ngai, S. C. (2018). E-

- cadherin: Its dysregulation in carcinogenesis and clinical implications. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 121, S. 11-22.
- Wu, J., Li, S., & Zhang, P. (2022). Tumor-derived exosomes: immune properties and clinical application in lung cancer. *Cancer Drug Resistance*, 5(1), S. 102-113.
- Wu, Q., Mao, H., Jiang, Z., & Tang, D. (2024). Tumour-associated neutrophils: Potential therapeutic targets in pancreatic cancer immunotherapy. In *Immunology* 172(3), S. 343–361.
- Wulff, S., Pries, R., Börngen, K., Trenkle, T., & Wollenberg, B. (2009). Decreased levels of circulating regulatory NK Cells in patients with head and neck cancer throughout all tumor stages. *Anticancer Research*, 29(8), S. 3053-3057.
- Xiong, S., Dong, L., & Cheng, L. (2021). Neutrophils in cancer carcinogenesis and metastasis. *Journal of Hematology and Oncology*, 14(1), Nr.173.
- Yang, L., & Zhang, Y. (2017). Tumor-associated macrophages: from basic research to clinical application. *Journal of Hematology & Oncology*, 10(1), Nr. 58.
- Yang, Y., Li, C.-W., Chan, L.-C., Wei, Y., Hsu, J.-M., Xia, W., Cha, J.-H., Hou, J., Hsu, J. L., Sun, L., & Hung, M.-C. (2018). Exosomal PD-L1 harbors active defense function to suppress t cell killing of breast cancer cells and promote tumor growth. *Cell Research*, 28(8), S. 862-864.
- Yi, M., Jiao, D., Xu, H., Liu, Q., Zhao, W., Han, X., & Wu, K. (2018). Biomarkers for predicting efficacy of PD-1/PD-L1 inhibitors. *Molecular Cancer*, 17(1), Nr. 129.
- Yuana, Y., Koning, R. I., Kuil, M. E., Rensen, P. C. N., Koster, A. J., Bertina, R. M., & Osanto, S. (2013). Cryo-electron microscopy of extracellular vesicles in fresh plasma. *Journal of Extracellular Vesicles*, 2(1), Nr. 21494.
- Yunna, C., Mengru, H., Lei, W., & Weidong, C. (2020). Macrophage M1/M2 polarization. *European Journal of Pharmacology*, 877, Nr. 173090.
- Zhang, X., Zhang, W., Yuan, X., Fu, M., Qian, H., & Xu, W. (2016). Neutrophils in cancer development and progression: Roles, mechanisms, and implications (Review). *International Journal of Oncology*, 49(3), S. 857-867.
- Zhu, R., Gires, O., Zhu, L., Liu, J., Li, J., Yang, H., Ju, G., Huang, J., Ge, W., Chen, Y., Lu, Z., & Wang, H. (2019). TSPAN8 promotes cancer cell stemness via activation of sonic Hedgehog signaling. *Nature Communications*, 10(1), Nr. 2863.
- Zwiener, I., Blettner, M., & Hommel, G. (2011). Überlebenszeitanalyse. *Deutsches Ärzteblatt*, 108(10), S. 163-169.

7 Eidesstaatliche Erklärung

Ich erkläre, dass ich die der Fakultät für Medizin Regensburg zur Promotion eingereichte Dissertation mit dem Titel **„Die Expression einer Gensignatur, die mit der Produktion von extrazellulären Vesikeln korreliert, prägt die Immunlandschaft des Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinoms“** in der Klinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie unter Betreuung von PD Dr. Dr. Johannes Meier mit der Unterstützung durch Dr. Nils Ludwig ohne sonstige Hilfe durchgeführt und bei der Abfassung der Dissertation keine anderen als die dort aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe. Die Gelegenheit zum vorliegenden Promotionsverfahren ist mir nicht kommerziell vermittelt worden. Insbesondere habe ich keine Organisation eingeschaltet, die gegen Entgelt Betreuerinnen und Betreuer für die Anfertigung von Dissertationen sucht oder die mir obliegenden Pflichten hinsichtlich der Prüfungsleistungen für mich ganz oder teilweise erledigt. Ich habe diese Dissertation bisher an keiner in- oder ausländischen Hochschule zur Promotion eingereicht. Weiterhin versichere ich, dass ich den beantragten Titel bisher noch nicht erworben habe. Teile der Ergebnisse der Dissertation wurden in dem Journal „Clinical and Experimental Immunology“ sowie „Journal of Extracellular Vesicles“ veröffentlicht und als Posterpräsentation auf dem 3rd International Symposium on Tumor-Host Interaction in Head and Neck Cancer 2022 in Essen präsentiert.

8 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater PD Dr. Dr. Johannes Meier, der mir die Durchführung dieses interessanten Projekts ermöglicht hat.

Ganz besonders möchte ich Dr. Nils Ludwig für die ausgezeichnete Betreuung, die intensive wissenschaftliche Beratung, die fantastischen Ideen und die gute Erreichbarkeit danken.

Ein herzliches Dankeschön geht an meine Tante MSc Ursula Standhartinger, die diese Arbeit aufmerksam auf Rechtschreibfehler überprüft hat.

Insbesondere möchte ich mich bei meiner Großmama Maria Standhartinger, meinen Schwestern BSc Viktoria Wimmer und Johanna Kallinger sowie meinem Onkel Ing. Hubert Standhartinger für die bedingungslose Unterstützung während meines Studiums und ihr offenes Ohr von ganzem Herzen bedanken.

Tief verbunden und dankbar bin ich meinem Freund, Daniel Lipp, für seine unglaublich hilfreiche Unterstützung und sein Verständnis bei der Anfertigung dieser Doktorarbeit.

Abschließend möchte ich meiner Mutter Helene Kallinger meinen größten Dank aussprechen. Sie hat mich bei allen meinen Entscheidungen immer unterstützt, mich immer wieder aufs Neue motiviert und ist am meisten stolz auf meine Erfolge.