

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

Klinische Relevanz des Smad-Signalwegs im Plattenepithelkarzinom des Kopf-Hals-
Bereichs

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Zahnmedizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Theresa Johanna Jordan

2025

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

Klinische Relevanz des Smad-Signalwegs im Plattenepithelkarzinom des Kopf-Hals-
Bereichs

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Zahnmedizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Theresa Johanna Jordan

2025

Dekan:	Prof. Dr. Dirk Hellwig
1. Berichterstatter:	PD Dr. Dr. Gerrit Spanier
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. Dr. Ramona Erber
Tag der mündlichen Prüfung:	19.08.2025

Teile der vorliegenden Arbeit wurden in der folgenden wissenschaftlichen Arbeit veröffentlicht:

„TGFβ carrying exosomes in plasma: potential biomarkers of cancer progression in patients with head and neck squamous cell carcinoma”.

Ludwig N, Yerneni SS, Harasymczuk M, Szczepański MJ, Głuszko A, Kukwa W, **Jordan T**, Spanier G, Taxis J, Spoerl S, Meier JK, Hinck CS, Campbell PG, Reichert TE, Hinck AP, Whiteside TL. TGFβ carrying exosomes in plasma: potential biomarkers of cancer progression in patients with head and neck squamous cell carcinoma. British Journal Cancer. 2023 May 18;128(9):1733–41.

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung.....	6
1.1 Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereichs.....	6
1.1.1 Epidemiologie und Ätiologie	6
1.1.2 Pathogenese	7
1.1.3 Diagnostik und Therapie.....	7
1.1.4 Tumormikroumgebung	11
1.2 Der TGF β -Signalweg.....	12
1.2.1 Die Familie der Wachstumsfaktoren.....	12
1.2.2 Aufbau und Aktivierung von TGF β	13
1.2.3 TGF β -Signalgebung	13
1.2.4 Merkmale der Smad-Proteine.....	15
1.3 Der TGF β -Signalweg in der Tumormikroumgebung	16
1.3.1 TGF β als Tumorsuppressor.....	16
1.3.2 TGF β als Tumorpromotor	16
1.4 Komponenten des TGF β Signalwegs als klinische Biomarker	18
1.5 Der TGF β -Signalweg als potenzielle therapeutische Zielstruktur.....	20
1.6 Ziel der Studie	21
2 Material und Methoden	24
2.1 Genexpression.....	24
2.1.1 Analyse der Genexpression in der TCGA-Kohorte	24
2.1.2 Analyse der Überlebensdaten in der TCGA-Kohorte.....	25
2.1.3 Analyse von klinischen Parametern in der TCGA-Kohorte	25
2.1.4 Korrelationsanalyse mit Immunregulatorischen Faktoren.....	25
2.1.5 Korrelationsanalyse mit tumorfördernden Gensignaturen	26
2.2 Proteinexpression	26
2.2.1 Immunhistochemie	26

2.2.2 Auswertung der Gewebefärbung	27
2.3 Statistik	27
3 Ergebnisse.....	29
3.1 Genexpression.....	29
3.1.1 Analyse der Genexpression in der TCGA-Kohorte	29
3.1.2 Analyse der Überlebensdaten in der TCGA-Kohorte.....	30
3.1.3 Analyse von klinischen Parametern in der TCGA-Kohorte	33
3.1.4 Korrelationsanalyse mit immunregulatorischen Faktoren	35
3.1.5 Korrelationsanalyse mit tumorfördernden Gensignaturen	41
3.2 Die Rolle der Smad3-Proteinexpression	43
3.2.1 Charakterisierung des Patientenkollektivs.....	45
3.2.2 Vergleich von gesundem Gewebe mit Tumorgewebe	47
3.2.3 Geschlechtsspezifische Unterschiede der Tumorproben	48
3.2.4 Altersabhängige Faktoren in Bezug auf die Tumorphathogenese	48
3.2.5 Analyse der Tumorproben unterschiedlicher Lokalisationen	49
3.2.6 Einfluss der TNM-Klassifikation auf die Tumorphathologie	50
3.2.7 Tumorcharakteristika in Abhängigkeit vom Grading	51
3.2.8 Auswirkung der Stage auf die Tumorphathogenese.....	52
4 Diskussion	54
5 Zusammenfassung	63
6 Anhang	64
6.1 Abkürzungsverzeichnis	64
6.2 Tabellenverzeichnis	66
6.3 Abbildungsverzeichnis	66
6.4 Liste der Markergene tumorfördernder Krebssignaturen, modifiziert nach Menyhart <i>et al.</i> [88]	68
7 Literaturverzeichnis	75

8 Danksagung	.
9 Lebenslauf	.
10 Eidesstattliche Erklärung	.

1 Einleitung

1.1 Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereichs

1.1.1 Epidemiologie und Ätiologie

Weltweit erkranken jährlich mehr als 800.000 Menschen neu an Kopf-Hals-Karzinomen und es werden etwa 450.000 Todesfälle registriert [1]. Damit stehen die Kopf-Hals-Karzinome an der 6. Stelle der weltweit häufigsten Tumorerkrankungen [1,2]. Den größten Teil der Kopf-Hals-Karzinome machen die Plattenepithelkarzinome (Head and Neck Squamous Cell Carcinoma, HNSCC) aus, welche aus dem Schleimhautepithel in Mundhöhle, Pharynx und Larynx hervorgehen können [2]. Zu einem deutlich geringeren Teil kommen Adenokarzinome, vor allem in den Speicheldrüsen, und mit einem noch geringeren Anteil maligne Lymphome, Sarkome und maligne Melanome vor [3].

In Deutschland kam es im Jahr 2018 zu über 17.000 Krebsneuerkrankungen im Bereich des Mund- und Rachenraumes und des Kehlkopfes [3]. Bei den Männern machte dies bezogen auf die Lokalisationen aller Krebsneuerkrankungen 4,7 % aus, wobei seit 2011 ein leichter Rückgang zu beobachten ist [3]. Bei Frauen tritt ein Tumor in diesem Bereich (mit etwa 1,9 %) seltener auf und die Werte sind seit 2011 annähernd konstant [3]. Die 5-Jahres-Überlebensrate beträgt in Deutschland bei Männern 52 % und bei Frauen 62 % [3]. Dies ist darauf zurückzuführen, dass bei Männern ein größerer Anteil der Krebserkrankungen von Mundboden, Zunge und Rachen durch Tabak- und Alkoholkonsum hervorgerufen wird, welcher mit einer geringeren Überlebenswahrscheinlichkeit korreliert [3].

Neben Tabak- und Alkoholkonsum, als geographisch am weitesten verbreitete Hochrisikofaktoren [2], gehört auch die Exposition gegenüber Umweltschadstoffen [4], eine schlechte Mundhygiene [5], sowie eine nährstoffarme Ernährung [6] zu weiteren Risikofaktoren. Auch bestimmte genetische Prädispositionen, die beispielsweise bei Menschen mit einer Fanconi Anämie auftreten, sind als Risikofaktoren bekannt [7]. Die Infektion mit viralen Erregern, wie den Humanen Papillomviren (HPV), konnte ebenfalls als Risikofaktor identifiziert werden [8]. Je nachdem, ob ein HNSCC mit oder ohne HPV-Infektion einhergeht, kann dieses entsprechend in HPV-negativ oder HPV-positiv unterteilt werden [8]. Im Allgemeinen ist die Prognose bei HPV-positiven Tumoren günstiger als bei HPV-negativen [2].

1.1.2 Pathogenese

Die Bildung eines invasiven HNSCCs beginnt histologisch gesehen mit einer Epithelzellhyperplasie, gefolgt von einer Dysplasie, die in leicht, mittelschwer und schwer eingeteilt werden kann [2]. Eine Dysplasie kann sich weiterhin zu einem *Carcinoma in situ* und dann schließlich bei Durchbrechung der Basalmembran zu einem invasiven Karzinom entwickeln [2].

Das HNSCC ist durch eine genetische Instabilität gekennzeichnet und es treten je nach Progression spezifische genetische Veränderungen auf [2]. Bei HPV-negativen Tumoren sind davon vor allem die Tumorsuppressorgene wie *TP53* und *CDKN2A* betroffen, die für p16^{INK4A} und p53 kodieren [2]. HPV-positive Tumoren zeigen dagegen häufig Domänenmutationen des Onkogens *PIK3CA*, einen Verlust von *TRAF3* und eine Vermehrung des Zellzyklusgens *E2F1* [9]. Dies führt schließlich zu einer Hochregulierung von p16^{INK4A}, dessen Expression häufig zur Klassifikation in HPV-positiv und HPV-negativ herangezogen wird [2].

1.1.3 Diagnostik und Therapie

Die Früherkennung des HNSCCs kann im Rahmen der regelmäßigen zahnärztlichen Untersuchung, durch die Kontrolle bei einem Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgen, bei Hals-, Nasen- und Ohrenärzten oder Hausärzten und während des Hautkrebsscreenings von Hautärzten erfolgen [10]. Symptome eines HNSCCs sind von der anatomischen Lokalisation und von der Ätiologie des Tumors abhängig und äußern sich beispielsweise durch eine Beeinträchtigung und Schmerzen beim Essen und Sprechen, Ohrenschmerzen, Taubheitsgefühle, Blutungen oder Schwellungen am Hals [2]. Da das Wachstum anfangs oft schmerzlos ist, stellen sich die Patienten oftmals erst verzögert vor, was einen verspäteten Behandlungsbeginn mit sich bringen kann [10]. Besonders bei Patienten, bei denen typische Risikofaktoren, vorhandene Erkrankungen oder Veränderungen der Mundschleimhaut, wie eine Leukoplakie, bekannt sind, ist daher eine regelmäßige Kontrolle der Schleimhäute wichtig [10].

Bei Verdacht eines vorliegenden HNSCCs sollten zur Diagnostik des Primärtumors bildgebende Verfahren, wie Ultraschall Diagnostik, Computertomografie (CT) oder Magnetresonanztomographie (MRT) erfolgen und bei fortgeschrittenen Tumoren sind zusätzliche bildgebende Verfahren zum Ausschluss von Zweittumoren in Form eines CT-Thorax durchzuführen [2,10]. Vor Beginn der Tumorthherapie muss

der Tumor durch eine Biopsie mit einer anschließenden histopathologischen Untersuchung nachgewiesen werden [2,10].

Die Klassifikation des Tumors kann mit Hilfe des TNM-Systems der UICC (Union for International Cancer Control) erfolgen [10]: Anhand der Ausbreitung des Primärtumors (T), dem Fehlen oder Vorhandensein und der Ausbreitung von regionären Lymphknotenmetastasen (N) und dem Fehlen oder Vorhandensein von Fernmetastasen (M) kann eine Prognose aufgestellt werden (**siehe Tabelle 1 und 2**, aus der S3-Leitlinie für Diagnostik und Therapie des Mundhöhlenkarzinoms [10]). Eine höhere Kategorie in der TNM-Einteilung ist dabei in der Regel mit einer schlechteren Prognose verbunden [11,12].

Tabelle 1: TNM-Klassifikation für Tumore der Mundhöhle modifiziert, aus der S3-Leitlinie für die Diagnostik und Therapie des Mundhöhlenkarzinoms [10]

TNM-Klassifikation	Definition
<i>Größe und Ausdehnung des Primärtumors</i>	
TX	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
0	Kein Anhalt für Primärtumor
Tis	Carcinoma in situ
T1	Größte Tumorausdehnung ≤ 2 cm, Invasionstiefe (depth of invasion, DOI) ≤ 5 mm
T2	Größte Tumorausdehnung ≤ 2 cm, DOI > 5 mm und ≤ 10 mm oder Tumor > 2 cm aber ≤ 4 cm, und DOI ≤ 10 mm
T3	Größte Tumorausdehnung > 4 cm oder jeder Tumor > 10 mm DOI
T4	Infiltration von Nachbarstrukturen
<i>Zahl und Lage der befallenen Lymphknoten</i>	
NX	Regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden
N0	Keine regionären Lymphknotenmetastasen
N1	Metastase in solitärem ipsilateralem Lymphknoten bis 3cm und ENE (-) (extranodal extension, extranodales Wachstum)
N2a	Metastase in solitärem ipsilateralem Lymphknoten bis 3cm und ENE(+); oder Metastase in solitärem ipsilateralem Lymphknoten 3 bis 6cm und ENE(-)

N2b	Metastasen in multiplen ipsilateralen Lymphknoten, keiner größer als 6 cm und ENE(-)
N2c	Metastasen in bilateralen oder kontralateralen Lymphknoten, keiner größer als 6 cm und ENE(-)
N3a	Metastasen in solitären Lymphknoten größer als 6cm und ENE(-)
N3b	Metastasen in solitären ipsilateralen Lymphknoten größer 3cm und ENE(+); ODER Metastase in multiplen ipsilateralen, kontralateralen ODER bilateralen Lymphknoten, davon mindestens eine ENE(+); ODER Metastase in einem solitären kontralateralen Lymphknoten, 3 cm oder kleiner und ENE(+)

Auftreten von Fernmetastasen

MX	Fernmetastasen können nicht beurteilt werden
M0	Keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastase(n)

Tabelle 2: Tumorstadien nach UICC-Kriterien modifiziert, aus der S3-Leitlinie für die Diagnostik und Therapie des Mundhöhlenkarzinoms [10]

Stadium	T	N	M
0	Tis	N0	M0
I	T1	N0	M0
II	T2	N0	M0
III	T1, T2	N1	M0
	T3	N0, N1	M0
IVA	T1, T2, T3	N2	M0
	T4a	N0, N1, N2	M0
IVB	T4b	jedes N	M0
	jedes T	N3	M0
IVC	jedes T	jedes N	M1

Die Therapie eines HNSCCs ist multimodal, abhängig von der Lage und der Größe des Primärtumors und dem Allgemeinzustand des Patienten und muss die behandlungsbedingten funktionellen und ästhetischen Konsequenzen berücksichtigen [10]. Laut der S3-Leitlinie zur Diagnostik und Therapie des Mundhöhlenkarzinoms besteht eine Behandlung entweder aus einer alleinigen chirurgischen Therapie, einer alleinigen Strahlentherapie oder aber aus einer Kombination aus beiden [10]. Die Strahlentherapie kann mit einer Chemotherapie kombiniert werden oder es erfolgt eine Kombination aller drei genannten Möglichkeiten [10]. Je nach Metastasierung der Halslymphknoten sollte zusätzlich eine Neck Dissektion erfolgen. Eine elektive Neck Dissektion kann mit einem geringeren Sterbe- und Rezidivrisiko einhergehen [10,13].

Die Gabe von Immun-Checkpoint-Inhibitoren (ICI) oder Epidermal-Growth-Factor-Receptor (EGFR-) -Antikörpern können die oben genannten Therapien ergänzen [10,14]. Weitverbreitet ist die Gabe des EGFR-Antikörpers Cetuximab [15]. Dieser wird zusammen mit einer Chemotherapie mit Platin- und 5-Fluorouracil bei Rezidiven oder metastasierenden Tumoren eingesetzt, wenn eine Lokalthherapie nicht mehr sinnvoll erscheint [10,14]. Cetuximab ist ein monoklonaler IgG1-Antikörper, welcher die Ligandenbindung an EGFR, einen Rezeptor für den epidermalen Wachstumsfaktor, hemmen kann [15]. EGFR wird häufig von Zellen des Kopf-Hals-Karzinoms exprimiert und dessen Expressionslevel gehen mit einer schlechten Prognose einher [16].

In neueren Studien, wie der Phase-3-Studie von Burtneß *et al.*, hat sich die Behandlung mit dem ICI Pembrolizumab ergänzend zu einer Platin- und 5-Fluorouracil-Chemotherapie als geeignete Erstlinienbehandlung für ein rezidivierendes oder metastasiertes Kopf-Hals-Karzinom als wirksam erwiesen [10,14]. Immuncheckpoints sind Oberflächenrezeptoren, bzw. Liganden von Immunzellen, und wirken als wichtige Kontrollpunkte des Immunsystems [17]: Sie können Angriffe der körpereigenen Zellen durch das Immunsystem verhindern [18]. Dies können sich Tumorzellen zunutze machen und sich so Angriffen des Immunsystems entziehen [18]. Die Funktionsweise von ICIs beruht entsprechend auf der Hemmung der Immuncheckpoints, wodurch die Abwehrreaktion des Immunsystems auf das Tumorgewebe wieder verstärkt werden soll [18]. Die ICIs richten sich entweder gegen einen Rezeptor (z.B. PD-1, Programmed Cell Death Protein 1) oder gegen den Liganden (z.B. PD-L1) [18].

Bei PD-L1-exprimierenden rezidivierenden oder metastasierenden Tumoren oder nach einer platinbasierten Chemotherapie ist eine Monotherapie mit Pembrolizumab möglich [10,14]. Bei Patienten mit einer Expression des Biomarkers PD-L1 konnte ein erhöhtes Gesamtüberleben bei Chemotherapie plus Pembrolizumab im Vergleich zu Chemotherapie plus Cetuximab festgestellt werden [14]. Aber auch bei PD-L1-negativen Tumoren konnte ein Ansprechen von einer Anti-PD-1/PD-L1-Therapie berichtet werden, wodurch die Verwendung der PD-L1-Expression als prädiktiver Marker immer noch umstritten ist [19]. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass nur ein kleiner Teil der Patienten von der Anwendung von ICIs profitiert, was die Notwendigkeit neuer validierter prädiktiver Biomarker verdeutlicht [20]. Dies spiegelt sich auch in den aktuell laufenden klinischen Studien wider, die darauf abzielen neue Immuntherapien zur Behandlung von Patienten mit HNSCC vor allem in Kombination mit den oben genannten Therapien zu entwickeln [21]. Weitere derzeit laufende Studien widmen sich der Impfstofftherapie, der angeborenen Immunaktivierung, der adoptiven T-Zell-Therapie, sowie der Photoimmuntherapie [21].

1.1.4 Tumormikroumgebung

Einer hohen Bedeutung für die Tumorentstehung, das Fortschreiten, die Metastasierung und das Ansprechen auf Therapien wird der Tumormikroumgebung (TMU) zugeschrieben [22]. Die TMU umfasst neben den Tumorzellen alle weiterhin vorkommenden Zelltypen und Bestandteile, wie Tumor-assoziierte Fibroblasten (CAFs), Endothelzellen, Tumor-assoziierte Makrophagen (TAM), angeborene und adaptive Immunzellen, sowie nicht zelluläre Komponenten, wie extrazelluläre Vesikel, Wachstumsfaktoren, Zytokine, Chemokine und Matrixproteine [22,23]. Unter den Zellen der TMU untereinander und im Austausch mit den Tumorzellen kann über komplexe Netzwerke durch Zytokine, Chemokine, Wachstumsfaktoren und Proteine der extrazellulären Matrix (EZM) eine Interaktion stattfinden [24]. Diese bewirkt beispielsweise während des Voranschreitens der Tumorerkrankung einige Veränderungen in dem umgebenden Stroma: Die TMU wird mit zunehmender Tumorgroße hypoxisch und sauer [25]. Um dem entgegenzuwirken, wird in der TMU die Angiogenese für die Sauerstoff- und Nährstoffversorgung und für das Entfernen von Stoffwechselabfällen hochreguliert [25]. Weiterhin kann die TMU zur Anti-Tumor-Immunität beitragen und hierbei auch die Tumorprogression fördern [26]. Dabei können die Immunzellen kontextabhängig hemmend oder fördernd auf das

Fortschreiten der Erkrankung wirken [26]. Unter den Immunzellen des adaptiven Immunsystems lassen sich vor allem zytotoxische CD8⁺-T-Zellen, die darauf abzielen Tumorzellen zu zerstören und proinflammatorische CD4⁺-T-Zellen für die Koordination zahlreicher Immunantworten finden [25]. Das Vorhandensein dieser Immunzellen wird beim HNSCC, wie auch bei anderen Krebserkrankungen, häufig mit positiven Ergebnissen in Verbindung gesetzt [25,27]. Regulatorische T-Zellen (Tregs) dagegen können die Tumorprogression durch Hemmung der Antitumor-Immunreaktion mit Hilfe von Interleukin-2 (IL-2) und der Sekretion von Wachstumsfaktoren fördern [25].

Darüber hinaus spielen CAFs und TAMs in der Tumorgenese eine wichtige Rolle [2,28]. CAFs können die Freisetzung von Wachstumsfaktoren (wie den Transformierenden Wachstumsfaktor β (TGF β) oder den vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor (VEGF)), sowie die Freisetzung von Zytokinen (wie IL-6) und Chemokinen regulieren und sie sind die Hauptquelle von Matrix-Metalloproteasen (MMPs), welche die Tumorzellproliferation, Angiogenese und Immunsuppression stimulieren können [2]. Im HNSCC ist außerdem eine Vielzahl an TAMs zu finden, welche in die Subpopulationen M1 und M2 kategorisiert werden können [28]. Während M1-Makrophagen proinflammatorisch und tumorhemmend wirken, produzieren M2-Makrophagen IL-10 und TGF β und weisen damit immunsuppressive Eigenschaften auf [28]. Es konnte gezeigt werden, dass in der TMU vom HNSCC größtenteils M2-Makrophagen zu finden sind [29].

1.2 Der TGF β -Signalweg

1.2.1 Die Familie der Wachstumsfaktoren

Die Familie der transformierenden Wachstumsfaktoren β umfasst über 30 strukturell ähnliche Polypeptide [30]. Dazu gehören knochenmorphogenetische Proteine (BMPs), Wachstums- und Differenzierungsfaktoren (GDFs), Activine und TGF β s [30]. Bei Säugetieren lassen sich drei Isoformen von TGF β nachweisen: TGF β 1, - β 2 und - β 3 [31]. Wobei die jeweilige Wirkung zytokinabhängig ist und vom Typ und Differenzierungszustand der Zielzellen bestimmt wird [31].

Der Wachstumsfaktor TGF β spielt eine zentrale Rolle für die Regulation verschiedener zellulärer Funktionen, wie Wachstum, Adhäsion, Migration, Apoptose und Differenzierung, und er ist wichtig in der Embryonalentwicklung [30]. TGF β wird in unzähligen Geweben des Körpers exprimiert, unter anderem von Mesenchymzellen,

Bindegewebe, Endothelzellen, Epithelzellen, Thrombozyten, B- und T-Lymphozyten und von Knochenzellen [32]. Ihm wird eine überaus wichtige Rolle bei der Entwicklung des Immunsystems und bei Entzündungsprozessen zugeschrieben [33]. Die meisten Immunzellen werden daher durch TGF β in ihren Funktionen beeinflusst und zusätzlich sind auch die meisten Immunzellen in der Lage TGF β zu produzieren [33].

1.2.2 Aufbau und Aktivierung von TGF β

Die Polypeptide der TGF β -Familie bestehen aus einem Sekretionssignalpeptid, einer Prodomäne (ca. 250 Aminosäuren) und der Wachstumsfaktordomäne (ca. 110 Aminosäuren) [34]. TGF β liegt im reifen Zustand als Homodimer vor, bestehend aus zwei Cystin-verknüpften Monomeren, die jeweils durch Disulfidbindungen zusammengehalten werden [35]. Das TGF β – Monomer wird wie in einer Zwangsjacke durch das Prosegment gehalten und die aktive Bindungsstelle wird durch ein LAP (Latency-Associated-Protein) verdeckt [36]. Um eine Interaktion mit den Zelloberflächenrezeptoren zu gewährleisten, ist eine Freisetzung des LAPs notwendig [36]. Der Komplex ist außerdem häufig über weitere Disulfidbindungen an ein Latent-TGF-Beta-Binding-Protein-(LTBP-)Molekül gebunden (**Abbildung 1A**) [37]. Der LAP/TGF β /LTBP – Komplex wird dabei über LTBP an Proteine der EZM gezeigt [37]. TGF β kann außerdem an das transmembrane Glycoprotein-A-Repetitions-Predominant-Protein (GARP) gebunden sein, siehe (**Abbildung 1B**) [38]. Über das Protein GARP kann ein LAP/TGF β /GARP-Komplex an der Zelloberfläche von Tregs und auf Thrombozyten präsentiert werden [39,40], welcher bei der Regulierung von Immunantworten von großer Bedeutung ist [38].

Die Regulation von TGF β wird durch ein komplexes Netzwerk von Signalwechselwirkungen beschrieben [34]. Zur Freisetzung von aktivem TGF β und zur Aktivierung von TGF β gibt es verschiedene Mechanismen, bei denen unter anderem die Protease Plasmin, MMPs, Thrombospondin-1 und bestimmte α V-Integrine beteiligt sein können [38,41]. Auch physikalisch-chemische Faktoren, wie UV-Strahlung, reactive oxygen species (ROS), Hitze, physikalische Scherkräfte und extreme pH-Werte, können eine Aktivierung von latentem TGF β herbeiführen [38].

1.2.3 TGF β -Signalgebung

Durch die Aktivierung von TGF β -Rezeptoren vom Typ Serin/Threonin-Kinasen wird der TGF β -Signalweg gestartet [30]. TGF β 1 und 3 haben eine hohe Affinität für TGF β -

Rezeptor Typ II (T β R-II) [42]. Die Aktivierung von T β RII führt zu einer nachfolgenden Aktivierung von T β RI in Form einer Phosphorylierung der Glycin-Serin reichen Domäne (GS-Domäne durch die Typ-II-Rezeptorkinase (**Abbildung 1C**) [42]. Der aktivierte T β RI-Rezeptor phosphoryliert wiederum die Mitglieder der Rezeptor-aktivierten-(R-)Smad-Familie Smad2 und Smad3, die daraufhin trimere Komplexe mit dem Co-Smad, Smad4, bilden [42]. Dieser Komplex kann in den Zellkern wandern und dort gemeinsam mit anderen nukleären Faktoren die Transkription von Zielgenen beeinflussen (**Abbildung 1C**) [42,43]. Da die Smad-Proteine selbst eine schwache Affinität zur DNA aufweisen, sind zusätzlich Transkriptionsfaktoren wichtig, um eine effiziente Genregulierung zu bewirken [33]. Diese Cofaktoren weisen eine starke kontext- und gewebeabhängige Wirkung auf [33].

Eine ähnliche Signalkaskade ist bei dem BMP-Signalweg zu finden (**Abbildung 1D**): Die Bindung des BMP-Liganden an die BMP-spezifischen Rezeptoren (Typ I und II) führt zu einer Aktivierung von Smad1, 5 und 8, welche daraufhin nach Interaktion mit Smad4 ebenfalls in den Zellkern wandern [44].

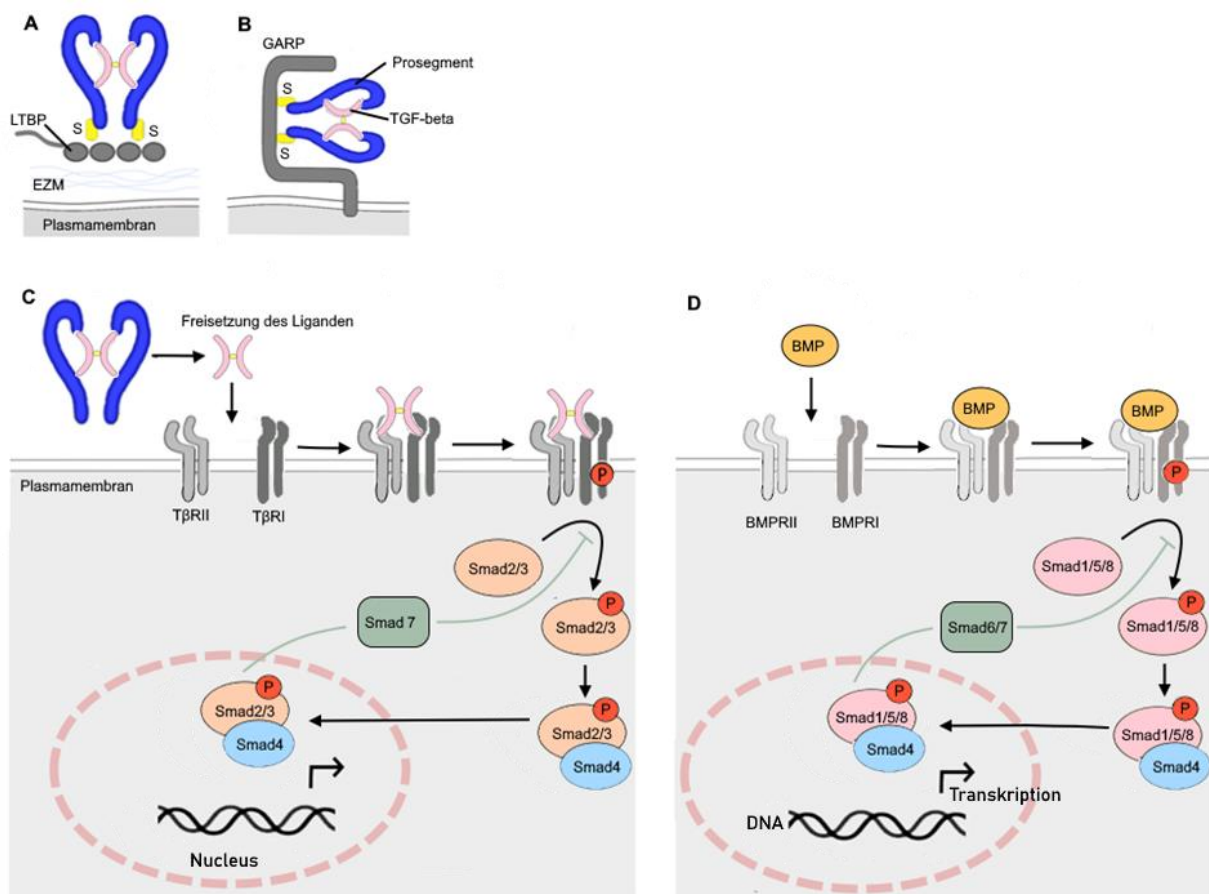


Abbildung 1: TGFβ- und BMP-Signalweg [43,44]

Die eigene Darstellung in Anlehnung an die Abbildungen von Derynck *et al.* und Dituri *et al.* [43,44] zeigt den TGF β - und BMP-Signalweg. **(A)** Der latente TGF β -Komplex bildet durch Disulfidbindungen (S) mit einem Latent-TGF-Beta-Binding-Protein-(LTBP-)Molekül einen großen latenten Komplex [43]. **(B)** Der latente TGF β -Komplex kann auch an das transmembrane Glycoprotein-A-Repetitions-Predominant-Protein (GARP) gebunden sein [43]. **(C)** Die Bindung des TGF β -Liganden an die Rezeptoren führt zur Aktivierung von T β RI, dies bewirkt eine Phosphorylierung von Smad2/3, welche daraufhin einen Komplex mit Smad4 bilden und in den Zellkern wandern, um dort die Genexpression zu regulieren [43]. **(D)** Die Bindung von BMP an die Rezeptoren führt zur Aktivierung des Typ-I-Rezeptors, dies bewirkt eine Phosphorylierung von Smad1/5/8, welche daraufhin ebenfalls einen Komplex mit Smad4 bilden. Dieser kann in den Zellkern wandern und die Transkription beeinflussen. Smad7 bewirkt im TGF β -Signalweg und Smad6 und 7 bewirken im BMP-Signalweg eine negative Rückkopplung [44].

1.2.4 Merkmale der Smad-Proteine

Für die TGF β -Familie sind die Smad-Proteine die wichtigsten Überträger, da sie die Veränderungen der Genexpression maßgeblich beeinflussen [43]. Die Smads umfassen acht strukturell verwandte Signalproteine [45], von denen fünf als Substrate für die TGF β -Rezeptorfamilie wirken: Smad1, Smad2, Smad3, Smad5 und Smad8. Sie werden als R-Smads bezeichnet [46]. Smad2 und 3 stehen in Verbindung mit TGF β -, Aktivin- und Nodal-Rezeptoren, Smad1, 5 und 8 wirken hingegen hauptsächlich mit BMP- und Anti-Mueller-Rezeptoren zusammen [46]. Als Co-Smad fungiert Smad4 und dient als gemeinsamer Partner für alle R-Smads [46]. Smad8 unterscheidet sich von Smad9 nur um zwei Aminosäuren und ist damit eng verwandt mit Smad9. Sie werden häufig zusammen genannt [47].

Eine hemmende Rolle im TGF β -Signalweg wird den Inhibitorischen Smads (I-Smad 6 und 7) zugeschrieben (**Abbildung 1C und D**; [43,44]): Sie konkurrieren mit den R-Smads um die Rezeptorbindung und führen zu einer Rekrutierung von Ubiquitinligasen. Diese bauen wiederum T β RII und R-Smads ab, um somit die Intensität und Dauer der Smad-abhängigen Signalübertragung zu modulieren [48]. Eine konstante Erfassung des Rezeptoraktivierungszustands kann dadurch gewährleistet werden, dass die R-Smads nach Anhäufung im Kern dephosphoryliert werden und in das Zytoplasma zurückkehren [46]. Zu beachten ist, dass es mehr Wachstumsfaktoren gibt als Rezeptoren [35]. Außerdem gibt es nur zwei Arten von intrazellulären Smad-Signalen, womit die funktionelle Vielfalt in der Signalübertragung begrenzt ist, die von den 33 Familienmitgliedern der Wachstumsfaktorfamilie induziert werden kann [35]. Die charakteristischen Eigenschaften der Wachstumsfaktoren beruhen auf einer molekularen Erkennung von entsprechenden akzessorischen Bindungsproteinen, die den Zugang der Wachstumsfaktoren zu den Signalrezeptoren regulieren [35].

1.3 Der TGF β -Signalweg in der Tumormikroumgebung

Der TGF β -Spiegel ist ein wichtiger Marker in der Karzinogenese von Tumoren [49] und seine Fehlregulierung kann einen großen Einfluss auf die Progression der Erkrankung nehmen [48]. Dabei ändert sich bei der Karzinogenese die Rolle des TGF β -Signalwegs häufig von tumorunterdrückend zu tumorfördernd [48].

1.3.1 TGF β als Tumorsuppressor

Der TGF β -Signalweg wirkt in normalen Epithelzellen oder in den frühen Stadien der Onkogenese als Tumorsuppressor [50] und sorgt für die Aufrechterhaltung der Homöostase durch Regulation von Proliferation und Apoptose [48]. Die TGF β -Signalgebung kann durch die Cyclin-abhängigen-Kinase-(CDK-)Inhibitoren p21 und p15 den Zellzyklus in der Phase G1 anhalten und damit das normale Zellwachstum hemmen [48]. Weiterhin können die Smads durch die Aktivierung von p53, Bcl-2-like-Protein11 (BCL2L11), Death-Associated-Protein-Kinase (DAPK) oder durch eine Herunterregulierung von aktivierten T β RI in Epithelzellen Apoptose induzieren [48].

1.3.2 TGF β als Tumorpromotor

In der TMU kann die Expression und Freisetzung von TGF β paradoxerweise Vorteile für den Tumor mit sich bringen [51]. So kann TGF β die Tumor-Immunüberwachung des Wirts hemmen und auf die Anti-Tumor-Immunität einwirken [51]. In Mausmodellen konnte gezeigt werden, dass orale Tumoren TGF β überexprimieren und dass es während der Karzinogenese zu einem signifikanten Anstieg des TGF β -Serumspiegels kommt [52,53]. Während des Tumorwachstums kommt es zu einem Verlust der zytostatischen und tumorsuppressiven Funktion von TGF β in Tumorzellen [41]. Dies kann durch Mutationen in Smad- und TGF β -Rezeptorgenen hervorgerufen werden [41]. Dadurch können die Tumorzellen resistent gegen TGF β werden und es kann zu einer Umdeutung von TGF β -Signalen in Tumorzellen kommen, was wiederum die Tumordinvasion und Metastasierung begünstigen kann [41]. Die Freisetzung von aktivem TGF β kann in Tumorzellen durch GARP vermittelt werden [41] und durch die Oberflächenexpression von GARP ist es den Tumorzellen möglich TGF β lokal zu konzentrieren [54,55]. TGF β kann auch von TAM produziert werden und durch Integrine (α v β 8) und MMP1 mobilisiert werden [49]. In der TMU werden TGF β folgende Wirkungen zugeschrieben (**Abbildung 2**):

- **Umbau der extrazellulären Matrix (Fibrose):** TGFβ unterstützt die Einbettung der EZM mit Kollagen Typ IV, Laminin und Fibronectin, da es Monozyten anlockt und die Expression von Integrinen bewirkt [56]. Außerdem bewirkt es eine verstärkte Bildung von Fibroblasten [57].
- **Angiogenese:** TGFβ fördert die Angiogenese, indem es auf die Endothelzellen wirkt und VEGF hochreguliert [58].
- **Wirkung auf das Immunsystem:** TGFβ kann in der TMU die Bildung und die Funktion von natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) in ihrer Anti-Tumor-Wirksamkeit unterdrücken [49]. Außerdem hemmt die TGFβ-Signalgebung die Antigenpräsentationsfähigkeit von Dendritischen Zellen (DCs), welche eine Schlüsselrolle in der Tumorummunität spielen [49]. Eine weitere Wirkung von TGFβ in der TMU ist die Förderung von Makrophagen des M2-Phänotyps [49]. Diesen wird eine entzündungshemmende und immunsuppressive Wirkweise mit proangiogenen Fähigkeiten zugeschrieben [49]. TGFβ bewirkt eine erhöhte Produktion von Tregs: Tregs reduzieren die CD8⁺-Entwicklung und die Expansion von T-Zellen mit Hilfe von Interleukin-2 (IL-2) [49]. Zudem kann TGFβ das zytotoxische Genprogramm in den T-Lymphozyten blockieren [59]. Es wird beobachtet, dass CD8⁺-T-Zellen eine verringerte zytotoxische Wirkung haben, welche die Differenzierung von CD4⁺-T-Zellen verändert und die IgG-Produktion hemmt [33].
- **Tumorausbreitung und Metastasen:** Der epithelial-mesenchymale Übergang (EMT) ist durch eine Abnahme epithelialer Zellverbindungen gekennzeichnet und kann bei Krebs durch TGFβ induziert werden, was eine Tumordinvasion und -ausbreitung begünstigt [60]. Außerdem lockt TGFβ in der TMU Monozyten an und bewirkt eine Hochregulation von Adhäsionsmolekülen, die eine Anheftung von weiteren Monozyten ermöglichen können [49]. Nachdem sich die Monozyten zu Makrophagen differenziert haben, können sie eine Undichtigkeit der Blutgefäße fördern [49].

Es konnte gezeigt werden, dass aufgrund dieser Eigenschaften die Aktivierung des TGFβ-Signalwegs eine Chemotherapieresistenz bei Darmkrebs, aber auch bei Plattenepithelkarzinomen fördern kann [61,62]. In einer weiteren Studie konnte in Ösophagus-Adenokarzinomzellen und in Xenotransplantat-Tumoren Resistenzen gegenüber Trastuzumab und Pertuzumab (monoklonale Antikörper) festgestellt

werden, die durch eine Aktivierung der TGF β -Signalgebung die EMT induziert haben [63].

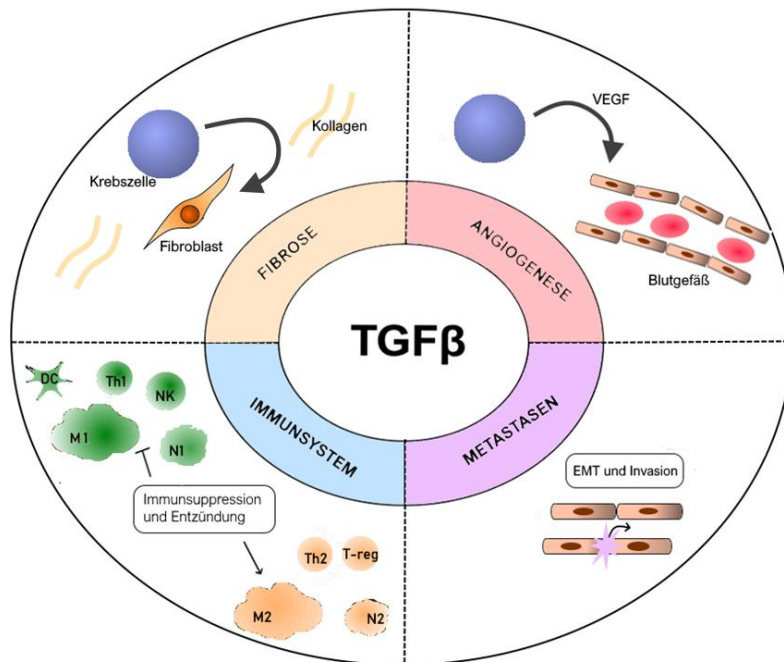


Abbildung 2: Tumorfördernde Wirkungen von TGF β in der TMU [64]

Die eigene Darstellung in Anlehnung an Neuzillet *et al.* [64] zeigt TGF β mit seinen tumorfördernden Wirkungen in der TMU:

Fibrose: TGF β bewirkt eine Kommunikation von Krebszellen und Fibroblasten und induziert damit die Aktivierung von diesen [33,64].

Angiogenese: TGF β verstärkt in Zusammenarbeit mit den Krebszellen die Angiogenese durch die Hochregulation von VEGF [58].

Metastasierung: TGF β bewirkt eine Verstärkung der Epithelialen-mesenchymalen Transition (EMT) und damit eine erleichterte Tumorinvasion und -ausbreitung [60].

Immunsystem: TGF β bewirkt eine Immunsuppression durch die Hemmung von M1-Makrophagen (M1), Dendritischen Zellen (DC), natürlichen Killerzellen (NK), Th1-Zellen, und N1-Neutrophilen (N1) und durch die Förderung von M2-Makrophagen, Treg-Zellen, N2-Neutrophilen (N2) und Th2-Zellen [64].

1.4 Komponenten des TGF β Signalwegs als klinische Biomarker

Das Messen von Biomarkern stellt eine Möglichkeit dar, um das Krebsrisiko von Patienten zu bestimmen, eine gute Patientenselektion durchführen zu können und um eine gute Voraussage für das Ansprechen einer Therapie zu treffen [49]. Die zielgerichtete Patientenauswahl ist durch die doppelte Rolle von TGF β als Tumorsuppressor und Tumorpromotor gerade bei den neueren Therapiemöglichkeiten, wie TGF β -Antagonisten, ein überaus wichtiger Faktor [49]. Als Biomarker sind Komponenten des TGF β -Signalwegs möglich, die zum Beispiel im Blut, Serum und Gewebe gemessen werden können [49]. Durch Signaturen von bestimmten Genexpressionen kann eine Voraussage auf ein Therapieansprechen

getroffen und damit die Behandlung optimiert werden [49]. Die Expression von TGF β kann außerdem in extrazellulären Vesikeln, die von Tumorzellen produziert werden (TEX, tumor-derived exosomes) bestimmt werden [65].

Zur Identifizierung der Komponenten des TGF β -Signalwegs, wie TGF β und Smads, können verschiedene Verfahren herangezogen werden: Zhu *et al.* untersuchten in ihrer Arbeit den Spiegel von phosphorylierten Smad2 (P-Smad2) und Gesamt-Smad2 mit Hilfe von Immunhistochemie (IHC) aus Gebärmutterhalskrebsgewebe vor und während einer Cisplatin-basierten Chemotherapie und konnten damit Rückschlüsse auf die Aktivierung des TGF β -Signalwegs ziehen [66]. Durch PCR-Analyse und ELISA-Verfahren konnten die aktiven Formen von TGF β und das Gesamt-TGF β gemessen werden [66]. Damit konnten sie feststellen, dass die TGF β -Signalgebung und die TGF β -Expression in menschlichen Eierstock- und Gebärmutterhalskrebszellen durch Chemotherapeutika aktiviert wird [66]. Des Weiteren wurde die durch Chemotherapeutika aktivierte Smad2- und Smad3-Phosphorylierung auf eine Blockade durch TGF β -Inhibitoren untersucht [66]. Zum Nachweis wurden hier der P-Smad2- und P-Smad3-Spiegel mithilfe eines Western-Immunoblot gemessen und es konnte gezeigt werden, dass TGF β -Inhibitoren eine Blockierung der Chemotherapeutika-induzierten Phosphorylierung von Smad2 und Smad3 bewirken können [66].

Tauriello *et al.* konnten bei genetisch rekonstituierten Dickdarmkrebsmetastasen durch IHC von P-Smad3 bei Galunisertib-Gabe, einem TGF β -Rezeptortyp-I- (TGFBR1-) spezifischen Inhibitor, eine reduzierte P-Smad3 Expression feststellen [59]. Durch die Erstellung von Genexpressionsprofilen von TGF β in Fibroblasten und T-Zellen stellten sie auch in diesen Zellen eine verringerte TGF β -Expression fest [59]. In anderen Untersuchungen konnte zum Beispiel in murinen Pten-defizienten Prostatastrüden im Frühstadium beobachtet werden, dass neuartige hochpotente trivalente TGF β -Rezeptorfallen die Tumorentstehung und Tumorzellinvasion hemmen [67]. Hierfür wurden Western Immunoblots für P-Smad2, P-Smad3, Gesamt-Smad2 und Gesamt-Smad3 zur qualitativen Beurteilung der Wirksamkeit der TGF β -Antagonisten genutzt [67]. Ähnliche Studien gibt es zur Untersuchung von Tumoren im Kopf-Hals-Bereich. In Maus-Modellen konnte beispielsweise durch eine Quantifizierung der Serumspiegel von bioaktivem TGF β mit Hilfe eines TGF β -Bioassay und durch die Darstellung der Expression von TGF β mit Hilfe einer Immunfluoreszenzfärbung festgestellt werden, dass es im Tumorgewebe zu einer Überexpression von TGF β und PD-L1 kommt und

dass die Blockade von TGF β die Tumorprogression im HNSCC hemmen kann [52]. Eine weitere Studie untersuchte die TGF β -Signalgebung im HNSCC in Abhängigkeit vom HPV-Status mithilfe der Daten des TCGAs (Cancer Genome Atlas) und Immunfluoreszenz von P-Smad2 und fand heraus, dass die TGF β -Expression im HPV-positiven HNSCC vergleichsweise verringert ist [68].

1.5 Der TGF β -Signalweg als potenzielle therapeutische

Zielstruktur

Ein Hindernis für immuntherapeutische Ansätze ist das immunsuppressive Wirken der TMU [69]. TGF β spielt hier eine Schlüsselrolle, da es als Tumorpromotor eine immunsuppressive TMU schafft und die Proliferation, Angiogenese, Invasion, Tumorprogression und Metastasierung von Krebszellen induziert [60]. In den letzten Jahren konnte in einigen *in vitro* und in präklinischen Modellen aufgezeigt werden, dass eine adjuvante Anti-TGF β -Therapie die Tumorprogression erfolgreich abschwächt [52]. Die Therapeutika können auf unterschiedliche Weise die TGF β -Signalübertragung stören: In Form von neutralisierenden Antikörpern, Ligandenfallen, niedermolekularen Inhibitoren oder Antisense-Oligonukleotiden können sie auf die Bioverfügbarkeit von TGF β , die Ligand-Rezeptor-Wechselwirkung, die Kinasedomäne der TGF β -Rezeptoren oder auf andere Signalmoleküle abzielen [33]. Die Therapien sollen somit die Invasion und Metastasierung von Tumorzellen hemmen, können die Tumorzellen aber nicht abtöten. Daher ist es sinnvoll diese Therapien mit adjuvanten Therapien zu kombinieren [70].

Niedermolekulare Inhibitoren der TGF β -Rezeptorkinase-Aktivität binden an die ATP-Bindungsdomäne der TGF β -R-Kinase und blockieren damit die nachgeschaltete Signalkaskade [49,70]. Der Kinase-Inhibitor LY2109761 konnte in präklinischen Studien die Strahlenempfindlichkeit von Glioblastomzellen und auch das Überleben in Tiermodellen verbessern [71]. Dabei hemmt es die Tumordinvasion und reduziert die Tumormikrogefäßdichte [71]. Vactosertib, Galunisertib und LY320882 sind weitere Beispiele solcher Inhibitoren, die sich teilweise noch in laufenden klinischen Studien befinden (NCT03143985, NCT05700656, NCT02452008, NCT02937272) [49].

TGF β -Ligandenfallen können die Ligand-Rezeptor-Wechselwirkungen beeinflussen, indem zum Beispiel Antikörper gegen den Liganden bzw. gegen die Rezeptoren verabreicht werden [70]. Alternativ können auch lösliche TGF β -

Rezeptoren bzw. mit Immunglobulinen fusionierte Rezeptoren verwendet werden [70]. Eine Behandlung mit AVID200 beispielsweise wird in einer aktuellen Phase-I-Studie bezüglich seiner Sicherheit und Verträglichkeit überprüft (NCT03834662) [70].

In einer kleinen klinischen Studie mit 14 HNSCC Patienten mit negativem HPV-Status wurde die Wirksamkeit von Bintrafusp alfa, überprüft [72]. Bintrafusp alfa ist ein bifunktionelles Fusionsprotein, welches PD-L1 blockiert und TGF β neutralisiert [72]. Hier konnte festgestellt werden, dass es sowohl zu einer Verstärkung der T-Zell-Antwort im Tumor als auch zu einer Verringerung der Tumor-Treg-Dichte und damit auch einer Verringerung immunsuppressiver Funktionen kam [72].

Antisense-Oligonukleotide (ASO), wie AP12009 (Trabedersen), verhindern die Expression von TGF β , indem sie an die TGF β -mRNA binden und die Translation verhindern [70]. *In vivo* konnte mit dieser Behandlung bei Prostatakrebs ein verringertes Tumorwachstum gezeigt werden [73].

Impfstoffbasierte Ansätze zur Modulation der TGF β -Signalübertragung, wie das autologe Tumorzellenprodukt Vigil, wurde in einer Phase-II-Studie bei Patientinnen mit Eierstockkrebs überprüft und konnte eine hohe Induktionsrate von T-Zell-Aktivierung und eine Korrelation mit einem verbesserten rezidivfreien Überleben (RFS) zeigen [74]. Sie wird aktuell in einer Phase-II/III-Studie überprüft (NCT02346747) [49].

Eine Therapie mit Anti-Integrinen, wie zum Beispiel 264RAD, wurde in präklinischen Modellen entwickelt, da eine hohe Integrinexpression mit einer erhöhten Verfügbarkeit von aktiviertem TGF β einhergeht [70]. In Modellen von Brust- und Prostatakrebs konnten Integrin blockierende Antikörper beispielsweise das Wachstum der Tumore hemmen [75].

Trotz der erfolgsversprechenden präklinischen Studien konnten die zahlreichen klinischen Studien diesen Erfolg nicht widerspiegeln: Einige Studien wurden vorzeitig beendet, andere zeigten kaum Vorteile oder sogar Nebenwirkungen [70].

1.6 Ziel der Studie

Trotz Fortschritten in den Behandlungsmöglichkeiten eines HNSCCs bleibt die Prognose der Patienten weiterhin schlecht [76]. In den letzten 30 Jahren kam es zu keiner nennenswerten Erhöhung der 5-Jahres-Überlebensrate [48]. Große Herausforderungen sind hier schlechte Ansprechraten und das Auftreten von Arzneimittelresistenzen [49]. Checkpoint-Inhibitoren konnten zwar beeindruckende

Erfolge bei der Behandlung verschiedener Krebsarten zeigen [77], laut der Konsenserklärung der Society for Immunotherapy of Cancer profitiert aber nur ein geringer Teil der Patienten mit einem HNSCC von den bisher zugelassenen Immuntherapien [21]. Daher gibt es große Bestrebungen wirksamere Behandlungen zu entwickeln und geeignetere Biomarker zur Vorhersage des Krebsrisikos und des therapeutischen Ansprechens zu finden [49].

TGF β ist mit seinen tumorfördernden Aktivitäten in den letzten Jahren zu einem wichtigen Ziel für die Entwicklung von Inhibitoren geworden [78]. Durch die Hemmung von TGF β kann die Anti-Tumor-Immunität erhöht werden, die zytotoxischen Reaktionen wieder aktiviert werden und die Immunzellen den Tumor vermehrt infiltrieren [33]. *In vitro* und in präklinischen Modellen konnte aufgezeigt werden, dass eine adjuvante Anti-TGF β -Therapie die Progression von Kopf-Hals-Karzinomen erfolgreich inhibiert: In verschiedenen Modellen konnte beispielsweise die Invasion und Metastasierung der Tumorzellen vom HNSCC und anderen Tumoren gehemmt, sowie die immunsuppressiven Funktionen von TGF β blockiert werden [52,59,66].

In zahlreichen klinischen Studien konnten diese Ergebnisse in verschiedenen malignen Entitäten leider nicht bestätigt werden und es konnten noch keine TGF β -Inhibitoren zugelassen werden [78], da sich bislang kaum Vorteile oder aber sogar weitreichende Nebenwirkungen bei Anti-TGF β -Therapien am Menschen herausgestellt haben [70]. Durch die Bedeutung von TGF β als Schlüsselrolle in der Aufrechterhaltung der Gewebshomöostase, wurden häufig kardiovaskuläre toxische Nebenwirkungen oder die Bildung gutartiger Tumoren beobachtet [70].

Diesen Beobachtungen entsprechend bedarf es für eine erfolgreiche Anti-TGF β -Therapie einer gezielten Patientenselektion, die durch das Messen von geeigneten Biomarkern möglich werden könnte. Einige Studien haben TGF β als Biomarker in verschiedenen Tumoren bereits ausführlich untersucht [59,66,67]. In Bezug auf das HNSCC wurde der TGF β -Signalweg bislang allerdings in nur wenigen Studien betrachtet [52,79]. Durch Analyse der Smad-Proteine als wichtiger Bestandteil des TGF β -Signalwegs könnten geeignete Biomarker gefunden werden, die zum Beispiel in Form von immunhistochemischen Analysen erfasst werden könnten, um die Auswahl der Patienten für eine Anti-TGF β -Therapie von HNSCC-Patienten zu erleichtern. Die Messung der Aktivität des Signalweges über die Smad-Proteine könnte hierbei genauere Ergebnisse erzielen als die Quantifizierung des Wachstumsfaktors TGF β . Denn dieser kann in der latenten/inaktiven oder in der

aktiven Form vorliegen, wobei nur die aktive Form von TGF β an die Rezeptoren für den TGF β -Signalweg binden kann [49]. Zusätzlich setzt die Aktivierung des TGF β -Signalwegs ein Vorhandensein des Rezeptorkomplexes voraus [49].

Im Rahmen der Doktorarbeit soll überprüft werden, ob die Expression der Smad-Proteine mit besonderen Eigenschaften des Tumors und seinen klinischen Parametern korreliert. Dazu sollen die verschiedenen Smads auf Protein- und Genebene sowohl im gesunden Gewebe als auch im Tumorgewebe untersucht werden, um schließlich herauszuarbeiten, inwieweit ein Zusammenhang mit der Tumorprogression besteht. Mithilfe von Daten aus der TCGA-Datenbank soll die Genexpression aller Einzel-Smads und Smad-Gruppierungen im Hinblick auf die klinischen Parameter, wie dem rezidivfreien Überleben und dem Gesamtüberleben, dem Lymphknotenstatus und der Tumor Stage analysiert werden. Zusätzlich soll ein Zusammenhang von den einzelnen Smads mit den Immunmerkmalen (Immunstimulatoren, Immuninhibitoren, Chemokinen und Leukozyten) überprüft werden, sowie eine Korrelation der Einzel-Smads mit den „Hallmarks of Cancer“ (Markenzeichen von Krebs) untersucht werden. Die „Hallmarks of Cancer“ beschreiben dabei die phänotypischen Merkmale der malignen Transformation und Progression eines Tumors [80]. Für die Analyse auf Proteinebene wurden des Weiteren Tumorproben aus einer Kohorte von HNSCC-Patienten auf Expressionsniveaus von P-Smad3 und T-Smad3 ausgewertet.

Mit dieser Arbeit soll somit herausgestellt werden, ob die Expressionslevel der Smads mit bestimmten Eigenschaften des Tumors korrelieren und ob dabei einzelne Smads herausstechen, die als geeignete Biomarker ausgewählt werden könnten, um die Tumorprogression der Patienten besser bewerten zu können.

2 Material und Methoden

Die Arbeit kann methodisch in zwei Abschnitte unterteilt werden. Im ersten Teil wurde die Genexpression mithilfe der TCGA-Datenbank untersucht. Aus diesen Daten wurde die Genexpression der R-Smads, des Co-Smads und der I-Smads mittels unterschiedlicher Analysetools (GEPIA, UALCAN und TISIDB) betrachtet. Im zweiten Teil der Arbeit wurden die Daten der Genexpression auf Proteinebene validiert. Hierfür wurde ein Tissue Microarray (TMA) immunhistologisch für Smad3, sowie phosphoryliertes Smad3 angefärbt.

2.1 Genexpression

Zur Untersuchung der Genexpression wurden Daten aus der TCGA-Datenbank verwendet. Die TCGA-Datenbank für Kopf- und Halskarzinome wurde mit dem Xena-Browser der University of California, Santa Cruz (UCSC) analysiert [81]. Insgesamt wurden 519 Fälle von primärem HNSCC in diese Studie eingeschlossen und mit 44 Proben verglichen, welche gesundes Gewebe aus den benachbarten Regionen eines HNSCCs darstellten. Boxplots, Kaplan-Meier-Überlebenskurven und Expressions-Heatmaps definierter Datensätze wurden online erstellt und anschließend wurden selektierte Daten zur statistischen Analyse heruntergeladen.

Es wurden folgende Gene im Gewebe des HNSCC und des gesunden Gewebes untersucht: R-Smads: *SMAD1*, *SMAD2*, *SMAD3*, *SMAD5*, *SMAD9*; Co-Smad: *SMAD4* und I-Smads: *SMAD6*, *SMAD7*.

2.1.1 Analyse der Genexpression in der TCGA-Kohorte

Die Genexpressionsniveaus der R-Smads (*SMAD1*, *SMAD2*, *SMAD3*, *SMAD5*, *SMAD9*), des Co-Smads (*SMAD4*) und der I-Smads (*SMAD6* und *SMAD7*) im Kopf-Hals-Karzinom und im gesunden Gewebe wurden mit Hilfe des Tools Gene-Expression-Profiling-Interactive-Analysis (GEPIA2) analysiert (<http://gepia2.cancer-pku.cn/#index> [82]). Es handelt sich um einen Webserver für die Erstellung von Genexpressionsprofilen, welcher interaktive Analysen ermöglicht [81]. Hierbei wurden die Daten von Proben aus der TCGA-Datenbank erfasst. Mit der Anwendung „Expression DIY“ ließen sich dynamische Expressionsprofile der gesuchten Einzelgene und Gengruppierungen (Signatures/Genset) in Form von Boxplots erstellen [81].

2.1.2 Analyse der Überlebensdaten in der TCGA-Kohorte

Das rezidivfreie Überleben (Disease Free Survival (RFS)) und das Gesamtüberleben (Overall Survival (OS)) bei hoher Genexpression und bei niedriger Genexpression wurde mit Hilfe von GEPIA2 analysiert. Mit dem Tool „Survival Analysis“ ließen sich über GEPIA2 Kaplan-Meier-Überlebenskurven erstellen [81]. Für die Hypothesenbewertung wurde der Log-Rank-Test angewendet. Die Schwellenwerte lagen bei dieser Untersuchung für hohe und niedrige Expressionsniveaus bei 50 % mit jeweils 259 Proben.

2.1.3 Analyse von klinischen Parametern in der TCGA-Kohorte

Die Expression der *SMAD*-Gene wurde mit Hilfe des **CAN**cer Data Analysis Portal der University of **AL**abama (UALCAN, <https://ualcan.path.uab.edu/analysis.html> [83]) in Birmingham in Bezug auf den Lymphknotenstatus und auf die Tumor Stage veranschaulicht. UALCAN ist ein Webportal zur Erleichterung der Analyse und Visualisierung der Genexpression von Tumoruntergruppen, welche ebenfalls auf Daten aus der TCGA-Datenbank basiert [84]. Mit Hilfe von UALCAN konnten so Boxplots erstellt werden, die das mRNA-Expressionsniveau der *SMAD*-Gene in Patienten mit verschiedenem Lymphknotenstatus oder Tumor Stages zeigen.

2.1.4 Korrelationsanalyse mit Immunregulatorischen Faktoren

Mithilfe der TISIDB-Plattform (Tumor-immune system interactions and drug bank database, <http://cis.hku.hk/TISIDB/index.php> [85]), einem Portal für Tumor-Immunsystem-Interaktionen, konnten Zusammenhänge zwischen Genen und Immunmerkmalen beschrieben werden. Dazu wurden multidimensionale Profildaten vom HNSCC aus der TCGA-Datenbank verwendet, um die Beziehung zwischen den Immunmerkmalen und -expression, Kopienanzahl, Methylierung und Mutation eines beliebigen Gens vorberechnen zu können. Unter Auswahl des jeweiligen Immunmerkmals konnte somit beurteilt werden, ob das ausgewählte Gen eine immunregulatorische Funktion im HNSCC aufweist [86]. Auf diese Weise wurden folgende Immunmerkmale untersucht: 45 Immunstimulatoren, 21 Immuninhibitoren, 36 Chemokine und 28 Subpopulationen von Leukozyten. Dabei wurden zur Auswahl der Immunmodulatoren und der Leukozyten-Typen die Ergebnisse der Studie von Charoentong *et al.* herangezogen [87].

Die Analyse der Korrelation zwischen Smad-Expressionsniveaus und Immunzellinfiltration, Chemokin- und Leukozytenniveaus erfolgte durch die Berechnung von Korrelationskoeffizienten nach Spearman (unter Angabe von Spearman-Rho) [86].

2.1.5 Korrelationsanalyse mit tumorfördernden Gensignaturen

Um die Korrelation der jeweiligen Smad-Expression mit den genomischen, epigenomischen, transkriptomischen und proteomischen Merkmalen der Tumore herauszuarbeiten, wurden folgende acht Faktoren als „Markenzeichen von Krebs“ analysiert: anhaltende proliferative Signalübertragung, Verlust von Wachstumssuppressoren, Apoptoseresistenz, replikative Unsterblichkeit, Angiogenese-Induktion, Invasions- und Metastasierungsaktivierung, genomische Instabilität, Entzündung und Umprogrammierung des Energiestoffwechsels. Mit Hilfe von GEPIA2 wurde die Pearson Korrelationsanalyse angewendet, um die Assoziation zwischen den einzelnen Smads und der Hub-Genexpression unter Verwendung von HNSCC-Daten der TCGA-Datenbank zu analysieren. Ein p-Wert von $< 0,05$ wurde als signifikant angesehen. Die R-Werte geben den Korrelationskoeffizienten nach Pearson an. In dieser Arbeit wurde die bereits erstellte umfassende Gliederung von Genen nach den entsprechenden Krebsmerkmalen von Menyhart *et al.* genutzt [88]. Eine Liste der Markergene, bei denen eine Expressionsänderung mit einem Kennzeichenmerkmal verknüpft ist, ist im Anhang ersichtlich. Insgesamt wurden dabei 671 Gene betrachtet, welche in die oben genannten acht Hauptkategorien eingeteilt wurden [88].

2.2 Proteinexpression

2.2.1 Immunhistochemie

Zur Analyse der Proteinexpression wurde eine Patientenkohorte mit 30 Fällen von HNSCC, 7 normalen Gewebeproben und 3 benachbarten nicht malignen Gewebeproben aus dem HN801c-BX Tissue Microarray (TMA) untersucht. Für die Immunhistochemie wurden aus Paraffinblöcken Tumorschnitte mit einer Schichtdicke von 4 μm hergestellt. Nachdem diese standardgemäß entparaffiniert wurden und die endogene Peroxidase blockiert wurde, konnte das Dako EnVision+ System gemäß den Anweisungen des Herstellers zum Färben verwendet werden. Nach einer

Inkubation über Nacht mit Primärantikörpern Anti-Smad3 (#9523, Cell Signalling, Denver, USA) und Anti-Phospho-Smad3 (#STJ114841, St. John's, Kanada), wurden die Paraffinschnitte mit einem mit Meerrettichperoxidase-konjugiertem Anti-Kaninchen-Ab behandelt und mit dem Peroxidase-Substrat (3,3'-Diaminobenzidin) inkubiert. Die Schnitte wurden mit Meyers Hämatoxylin gegengefärbt und mittels Glycerol-Gelee eingedeckt. Zusätzlich wurde ein Maus-Anti-Mensch-Pan-Cytokeratin Ab (Dako Cytomation, Hamburg, Deutschland) verwendet, um den epithelialen Ursprung von Tumorzellen in Gewebeschnitten zu bestätigen. Die Abs wurden bei Konzentrationen von 2–10 µg/ml verwendet.

2.2.2 Auswertung der Gewebefärbung

Angefärbte Gewebeschnitte wurden in einem Lichtmikroskop (Olympus 700, Olympus Corporation, Tokio, Japan) bei 400-facher Vergrößerung ausgewertet. Für die digitale Bildanalyse wurde die Software Adobe Photoshop Version 7.0 (San Jose, USA) verwendet. Die Tumorproben wurden ausgewertet und in fünf separaten Feldern untersucht. Die daraus resultierenden Ergebnisse wurden gemittelt. Die Bewertung basierte auf dem prozentualen Verhältnis positiver Tumorzellen pro Schnitt und der Intensität der Färbung. Die Färbung wurde wie folgt bewertet: keine, selten (< 25 % der Zellen gefärbt), variabel (~50 % der Zellen gefärbt) und positiv (~100 % der Zellen gefärbt). Die Intensität der Färbung wurde empirisch bestimmt und wie folgt definiert: schwach (=1), mäßig (=2) oder stark (=3). Der H Index (positive Zellen x Intensität der Färbung), der für die entsprechenden Expressionsniveaus im Tumorparenchym und im Tumorstroma steht, wurde berechnet und in statistischen Analysen in Korrelation zu den klinisch-pathologischen Daten gebracht.

2.3 Statistik

Kaplan-Meier-Plots wurden verwendet, um das Rezidiv-freie Überleben (RFS) und das OS auszuwerten. Zur Darstellung der Expressionsniveaus wurden Boxplots verwendet. Für die Analyse der Überlebenszeiten wurde ein Log-Rank-Test durchgeführt. Die Korrelationen zwischen den *SMAD*-Genen und den Immunmerkmalen wurden unter Verwendung nichtparametrischer Spearman-Korrelationen berechnet. Für die Korrelation der *SMAD*-Gene und den Merkmalen von Krebs wurde die Pearson-Korrelation angewendet. Für den Gruppenvergleich der IHC-Auswertung wurden one-way Analysis of Variance (ANOVA) Tests genutzt. Falls keine

Normalverteilung angenommen werden konnte, wurden im Rahmen der Varianzanalyse Kruskal-Wallis-Tests angewendet. Weiterhin erfolgte die Durchführung von Post-hoc-Tests für die isolierte Betrachtung. Hierbei wurde die Student-Newman-Keuls Methode angewendet. Alle Signifikanzen wurden mit Mann-Whitney-U-Tests überprüft. Im Falle einer Normalverteilung erfolgte die statistische Analyse über Student t-Tests. Die p -Werte $< 0,05$ wurden als statistisch signifikant angesehen.

3 Ergebnisse

3.1 Genexpression

3.1.1 Analyse der Genexpression in der TCGA-Kohorte

Im Tumorgewebe war bei *SMAD1*, *SMAD2*, *SMAD3*, *SMAD5*, *SMAD6* und *SMAD7* eine hochregulierte, allerdings nicht signifikant gesteigerte Expression im Vergleich zu den normalen Geweben zu erkennen (**Abbildung 3A und C**). Die Expression von *SMAD4* und *SMAD9* fiel dagegen, ebenfalls ohne signifikante Unterschiede, im Tumorgewebe geringer aus als im normalen Gewebe (**Abbildung 3A und B**). Zusammenfassend zeigte sich, dass die R-Smad-Expression (ausgenommen *SMAD9*) und die I-Smad-Expression, dabei vor allem das Expressionsniveau von *SMAD7*, im HNSCC erhöht war.

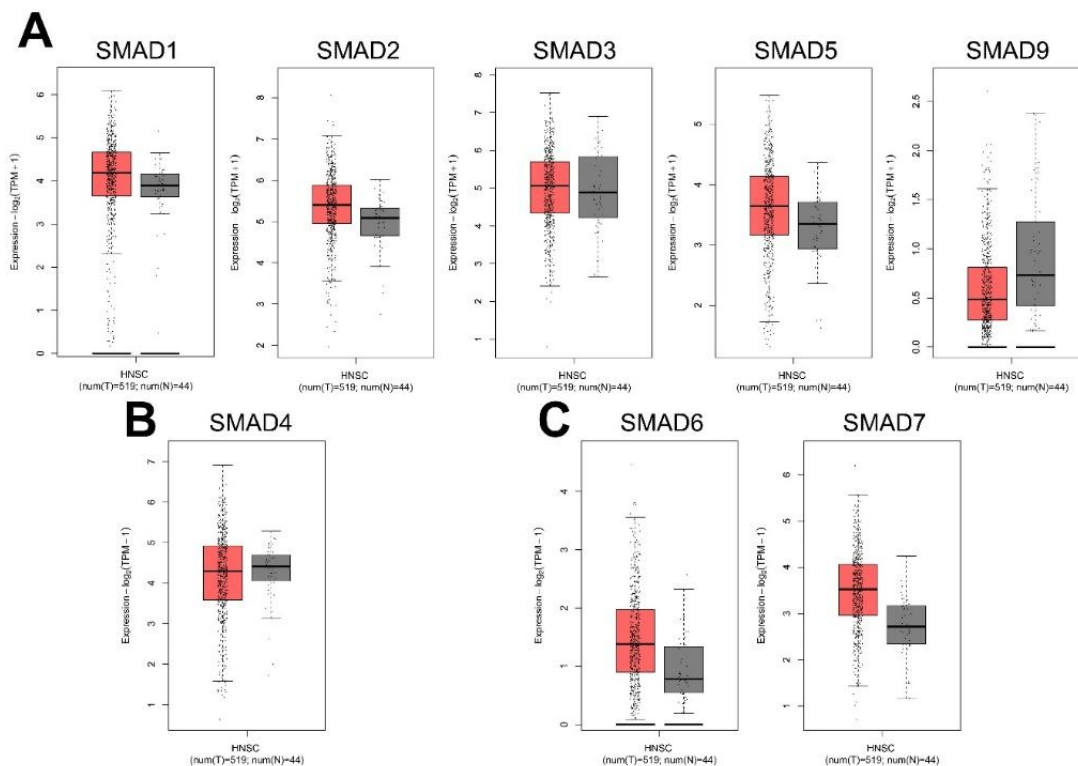


Abbildung 3: Vergleich der SMAD-Expression im Tumorgewebe und im gesunden Gewebe

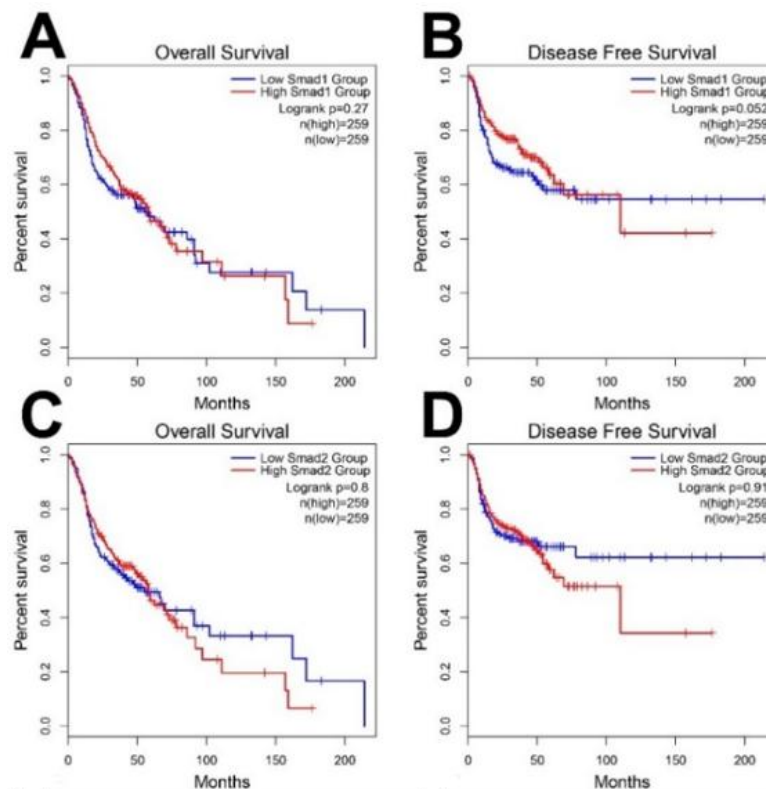
Boxplots der Expressionsniveaus der SMAD-Gene im HNSCC-Tumorgewebe (rot) und im gesunden Gewebe (grau) wurden in logarithmischer Darstellung aus der TCGA-Datenbank mittels GEPIA2 bestimmt. Die Box-Whisker-Plots zeigen den mittleren Bereich von 25-75% und die Minimum- und Maximum-Werte (**A**) R-Smads, (**B**) Co-Smad, (**C**) I-Smads. Bei Signifikanzniveau von $p < 0,01$ konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden.

3.1.2 Analyse der Überlebensdaten in der TCGA-Kohorte

Um das Überleben der Patienten im Hinblick auf die Expression der R-Smads, des Co-Smads und der I-Smads zu untersuchen, wurden die HNSCC-Patienten in eine Gruppe mit niedrigem Smad-Expressionsniveau (low-Smad-Group) und eine Gruppe mit hohem Smad-Expressionsniveau (high-Smad-Group) eingeteilt. Als Grenzwert wurde der Medianwert gewählt, der die Kohorte in je 259 Fälle aufteilte. Geprüft wurde die Smad-Expression sowohl in Bezug auf das Gesamtüberleben (Overall Survival, OS) als auch auf das tumorfreie Überleben (Disease Free Survival, DFS).

Die Kaplan-Meier-Überlebenskurven zeigten bei hoher und bei niedriger R-Smad-Expression bis auf das OS von *SMAD3* keine signifikante Korrelation der Smad-Expression mit dem OS bzw. dem DFS (**Abbildung 4A-D und F-J**). Die Werte für *SMAD2* waren zwar nicht statistisch signifikant, dennoch präsentierte der Graph in **Abbildung 4D** die Tendenz, dass die High-*SMAD2*-Gruppe mit einem niedrigeren DFS ($p = 0,91$) zusammenhängt.

Ein sehr eindrückliches Resultat lieferte die Analyse der *SMAD3*-Expression in Bezug auf das OS: Hier war ein signifikant besseres Gesamtüberleben in der Kohorte mit niedriger *SMAD3*-Expression zu finden ($p = 0,017$; **Abbildung 4E**). Eine weitere Untersuchung von Smad3 auch auf Proteinebene erschien somit als vielversprechend und wurde im zweiten Teil dieser Arbeit durchgeführt.



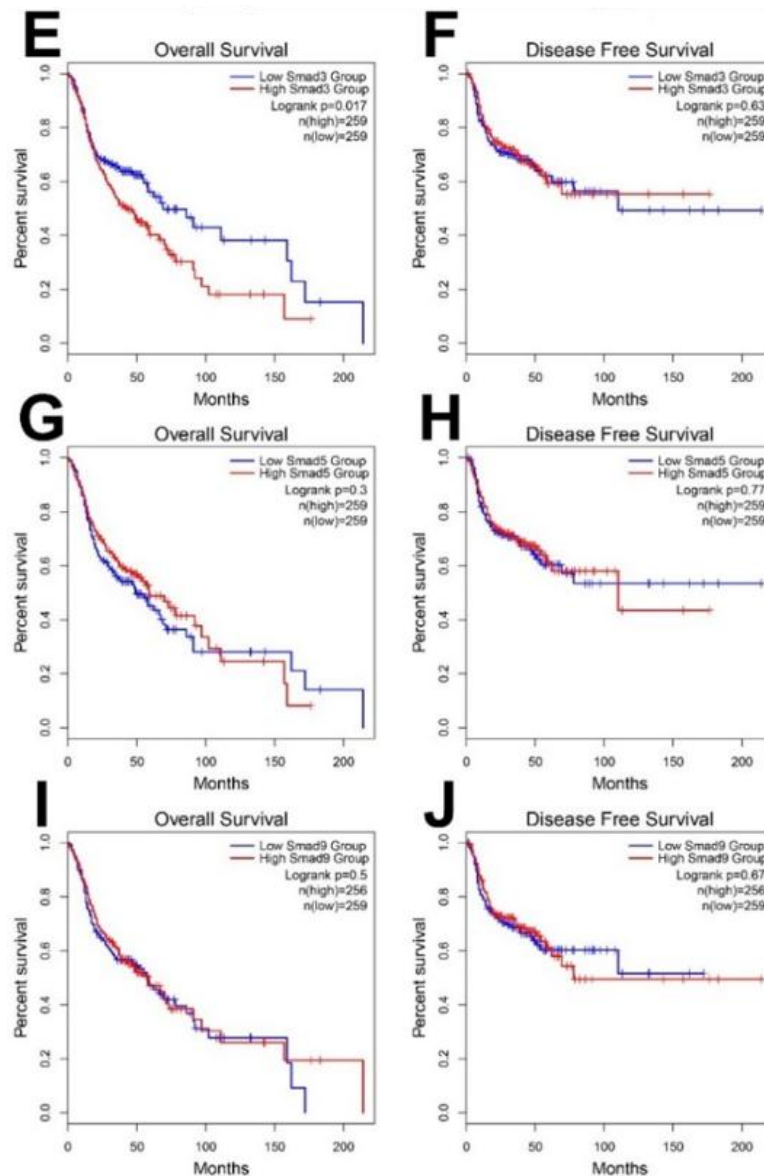


Abbildung 4: Gesamtüberleben und tumorfreies Überleben bei niedriger und hoher R-Smad-Expression

Die Kaplan-Meier-Überlebenskurven zeigen das tumorfreie Überleben (Disease Free Survival, DFS) und das Gesamtüberleben (Overall Survival, OS) in Monaten im HNSCC und geben so einen Vergleich von hohen (rot, High-Smad-Group) und niedrigen (blau, Low-Smad-Group) Expressionsniveaus von R-Smads wieder. Die Daten wurden mit GEPIA2 ermittelt und stammten aus der TCGA-Datenbank. Für die Hypothesenbewertung wurde der Log-Rank-Test verwendet. Der Cutoff-Wert für die hohe und die niedrige Expressionsgruppe liegt jeweils bei 50 %. **(A)** SMAD1-Expression und OS; **(B)** SMAD1-Expression und DFS; **(C)** SMAD2-Expression und OS; **(D)** SMAD2-Expression und DFS; **(E)** SMAD3-Expression und OS; **(F)** SMAD3-Expression und DFS; **(G)** SMAD5-Expression und OS; **(H)** SMAD5-Expression und DFS; **(I)** SMAD9-Expression und OS; **(J)** SMAD9-Expression und DFS.

Die Expression von *SMAD4* konnte im Rahmen der Analyse nicht mit einem signifikant veränderten OS oder DFS in Verbindung gebracht werden (**Abbildung 5A und B**). Dabei ist die Tendenz zu erwähnen, dass die High-*SMAD4*-Gruppe mit einem niedrigeren DFS korrelierte (**Abbildung 5B**).

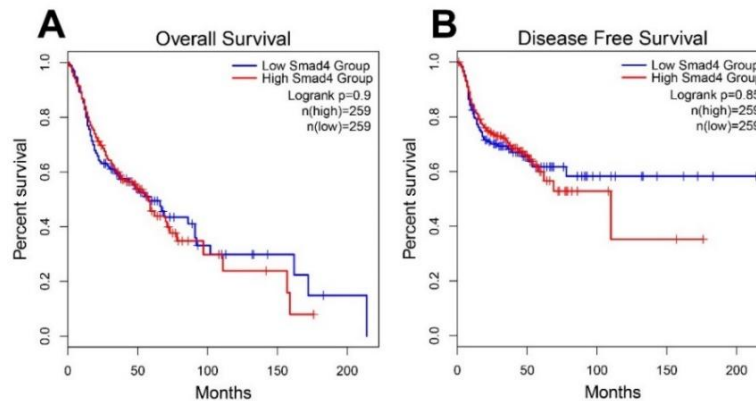


Abbildung 5: Gesamtüberleben und tumorfreies Überleben bei niedriger und hoher *SMAD4*-Expression

Die Kaplan-Meier-Überlebenskurven zeigen das tumorfreie Überleben (Disease Free Survival, DFS) und das Gesamtüberleben (Overall Survival, OS) in Monaten im HNSCC und geben so einen Vergleich von hohen (rot, High-Smad-Group) und niedrigen (blau, Low-Smad-Group) Expressionsniveaus vom Co-Smad *SMAD4* wieder. Die Daten wurden mit GEPIA2 ermittelt und stammten aus der TCGA-Datenbank. Für die Hypothesenbewertung wurde der Log-Rank-Test verwendet. Der Cutoff-Wert für die hohe und die niedrige Expressionsgruppe liegt jeweils bei 50 %. **(A)** *SMAD4*-Expression und OS; **(B)** *SMAD4*-Expression und DFS.

Die Analyse der *SMAD6*-Expression zeigte, dass eine hohe *SMAD6*-Expression mit einem signifikant längeren krankheitsfreien Überleben assoziiert war ($p = 0,028$; **Abbildung 6B**). Außerdem konnte anhand des Graphens in **Abbildung 6A** gezeigt werden, dass die Kohorte für eine hohe *SMAD6*-Expression ein längeres OS aufwies, wobei der ermittelte Wert knapp über der festgelegten Signifikanzschwelle lag ($p = 0,064$) (**Abbildung 6A**).

Die Daten bezüglich der *SMAD7*-Expression zeigten hingegen keine statistische Relevanz (**Abbildung 6C und D**). Die Kohorte mit einer hohen *SMAD7*-Expression schien im Gegensatz zu der Gruppe mit einer hohen *SMAD6*-Expression allerdings langfristig mit einem kürzeren DFS zusammenzuhängen ($p = 0,91$, **Abbildung 6D**).

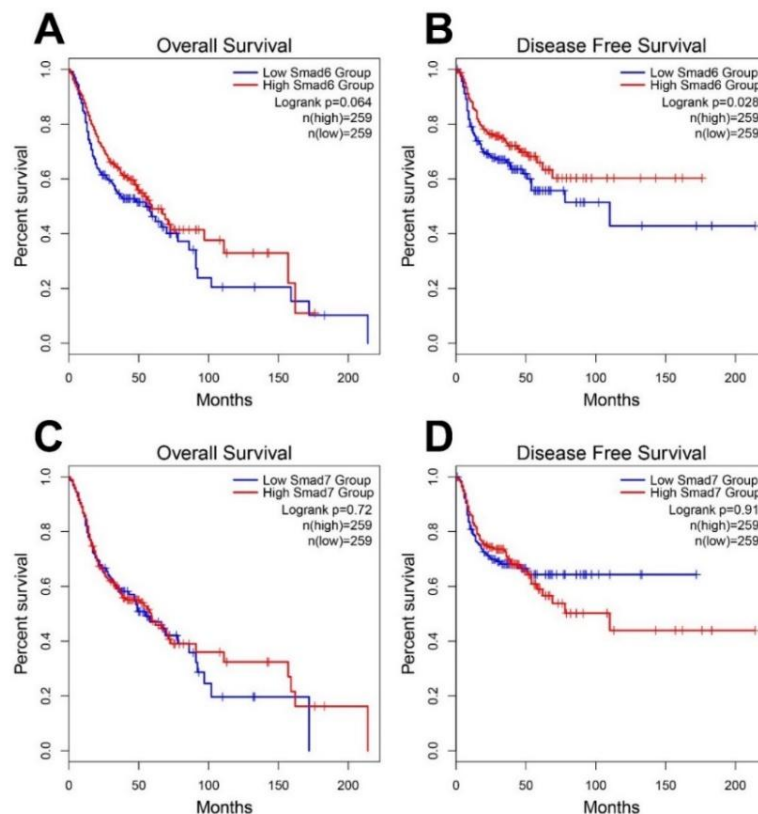


Abbildung 6: Gesamtüberleben und tumorfreies Überleben bei niedriger und hoher I-Smad - Expression

Die Kaplan-Meier-Überlebenskurven zeigen das tumorfreie Überleben (Disease Free Survival, DFS) und das Gesamtüberleben (Overall Survival, OS) in Monaten im HNSCC und geben so einen Vergleich von hohen (rot, High-Smad-Group) und niedrigen (blau, Low-Smad-Group) Expressionsniveaus von I-Smads wieder. Die Daten wurden mit GEPIA2 ermittelt und stammten aus der TCGA-Datenbank. Für die Hypothesenbewertung wurde der Log-Rank-Test verwendet. Der Cutoff-Wert für die hohe und die niedrige Expressionsgruppe liegt jeweils bei 50 %. **A** SMAD6-Expression und OS, **B** SMAD6-Expression und DFS, **C** SMAD7-Expression und OS, **D** SMAD7-Expression und DFS

3.1.3 Analyse von klinischen Parametern in der TCGA-Kohorte

Um mögliche Zusammenhänge der Expression der Smad-Gene mit den klinischen Parametern der Patienten zu erörtern, wurde sich in dieser Arbeit auf die Parameter Lymphknotenstatus und Tumorstage fokussiert.

Um die Expression in Patienten mit unterschiedlichem Lymphknotenstatus zu vergleichen, wurde die UALCAN-Datenbankanalyse genutzt und Subkohorten erstellt. Hierbei wurden die Expressionslevel in 176 Proben von Patienten ohne Lymphknotenbefall (N0), 67 Proben von Patienten mit einem N1-Status, 12 Proben

von Patienten mit einem N2-Status und 8 Proben von Patienten mit einem N3-Status miteinander verglichen.

Die durchgeführte Analyse in Proben von Patienten mit unterschiedlichem Lymphknotenstatus ergab weder bei den R- und I-Smads noch bei dem Co-Smad statistisch signifikante Ergebnisse (**Abbildung 7**). Tendenziell waren in Patienten mit fortgeschrittenem Lymphknotenstatus leicht gesteigerte Expressionslevel zu erkennen, insbesondere in Bezug auf die R-Smads.

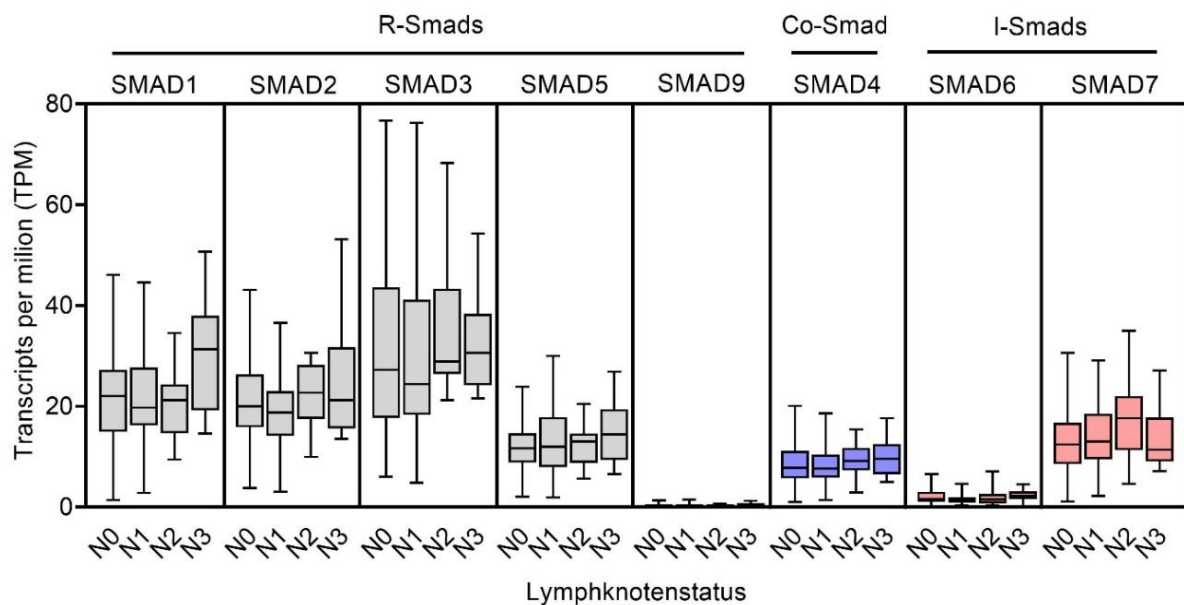


Abbildung 7: SMAD-Expression in Patienten mit verschiedenen Lymphknotenstatus

Die Boxplots zeigen das mRNA-Expressionsniveau (Transkripte-pro-Million-Werte) der R-Smads, des Co-Smads und der I-Smads in Patienten mit verschiedenen Lymphknotenstatus (N0-N3). Die Daten wurden mit der UALCAN-Datenanalyse bestimmt und stammen aus dem TCGA-Datensatz. Es konnten keine signifikanten Unterschiede beobachtet werden. Die Box- und Whisker-Plots zeigen den mittleren Bereich von 25-75% und die Minimum- und Maximum-Werte.

Zur Analyse der Genexpression in Bezug auf die Tumor Stage wurde ebenfalls die UALCAN-Plattform herangezogen. Hierzu wurden 27 Patienten mit Stage I Tumoren, 71 Patienten mit Stage II Tumoren, 81 Patienten mit Stage III Tumoren und 264 Patienten mit Stage IV Tumoren verglichen (**Abbildung 8**).

Insgesamt konnte kein Zusammenhang von Tumorstage der Patienten und der SMAD-Expression festgestellt werden (**Abbildung 8**). Als einzig signifikanter Unterschied zeigte sich die SMAD1-Expression, da diese in Patienten mit Stage II signifikant größer war als in Patienten mit Stage III ($p < 0,05$; **Abbildung 8**).

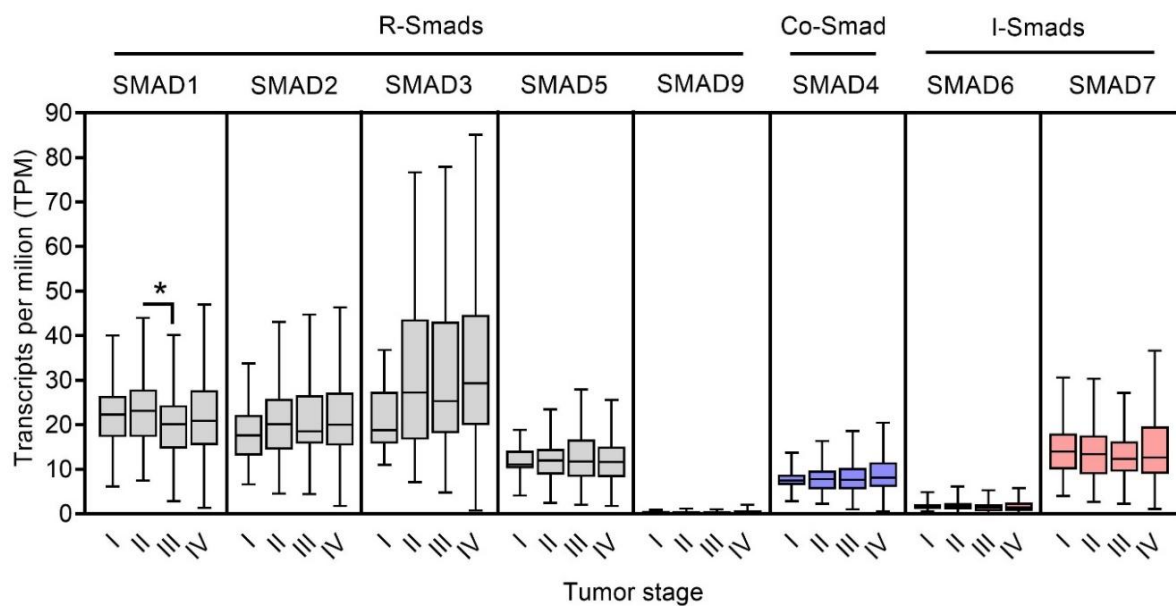


Abbildung 8: SMAD-Expression in verschiedenen Stages

Die Boxplots zeigen das mRNA-Expressionsniveau der R-Smads, des Co-Smads und der I-Smads in HNSCC Patienten mit verschiedenen Stages (Stage I bis Stage IV). Die Daten wurden mit der UALCAN-Datenanalyse bestimmt und stammten aus dem TCGA-Datensatz. * $p < 0,05$. Box- und Whisker-Plots zeigen den mittleren Bereich von 25-75% und die Minimum- und Maximum-Werte.

3.1.4 Korrelationsanalyse mit immunregulatorischen Faktoren

Um die Zusammenhänge der SMAD-Expression mit immunmodulatorischen Prozessen zu analysieren und somit einen möglichen Einfluss der Marker auf die Anti-Tumor-Immunantwort herauszuarbeiten, wurden auf Basis des TISIDB-Tools Heatmaps erstellt, welche die Korrelationen der SMAD-Expression mit der Expression von immunmodulatorischen Faktoren graphisch darstellen. Um einen möglichst weitreichenden Einblick zu bekommen, wurden 45 Immunstimulatoren, 21 Immuninhibitoren und 36 Chemokine ausgewählt. Zusätzlich wurde die Korrelation der SMAD-Expression mit der Infiltration von Immunzell-Subtypen in das Tumorgewebe ausgewertet.

Besonders auffällig war die hohe Korrelation von SMAD7 mit zahlreichen Immunstimulatoren (**Abbildung 9**): Der überwiegende Teil der immunstimulatorischen Marker zeigte hier hohe Korrelationskoeffizienten. Anders war es bei SMAD3: Eine hohe SMAD3-Expression korrelierte negativ mit der Vielzahl der immunstimulatorischen Marker. Es zeigte sich somit, dass das I-Smad SMAD7 mit

einer immunstimulatorischen TMU assoziiert war, wohingegen die immunstimulatorischen Faktoren in Tumoren mit hoher *SMAD3*-Expression runterreguliert waren. Bei Betrachtung der einzelnen Gene der immunstimulatorischen Faktoren fiel die Tumor-Nekrose-Faktor-Superfamilie (*TNF-SF*) mit sehr hohen Korrelationen zu fast allen *SMAD*-Genen auf, dabei zeigte nur *TNFSF9* negative Korrelationen. Die Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor-Superfamilie (*TNFRSF*) wies eine weniger ausgeprägte Korrelation mit der *SMAD*-Expression auf, mit Ausnahme von *TNFRSF9* und *TNFRSF17* (**Abbildung 9**).

Die Expression der Immun-Checkpoint-Moleküle wie *CD27*, *CD276*, *CD40*, *CD48*, *CD70*, *CD80* und *CD86* korrelierte nur schwach mit der Expression der *SMAD*-Gene (ausgenommen davon war die *SMAD7*-Expression). Die Expressionen von *CD28* und *CD40LG* dagegen zeigten tendenziell stärkere Zusammenhänge mit den Expressionen aller *SMAD*-Gene.

Andere Faktoren wie die 5'-Nukleotidase (*NT5E*), der Liganden-Poliovirus-Rezeptor (*PVR*) und das Retinsäure-Transkript 1E (*RAET1E*) wiesen wiederum eher geringe Korrelationen mit den Expressionslevel der einzelnen *SMAD*-Gene auf (**Abbildung 9**).

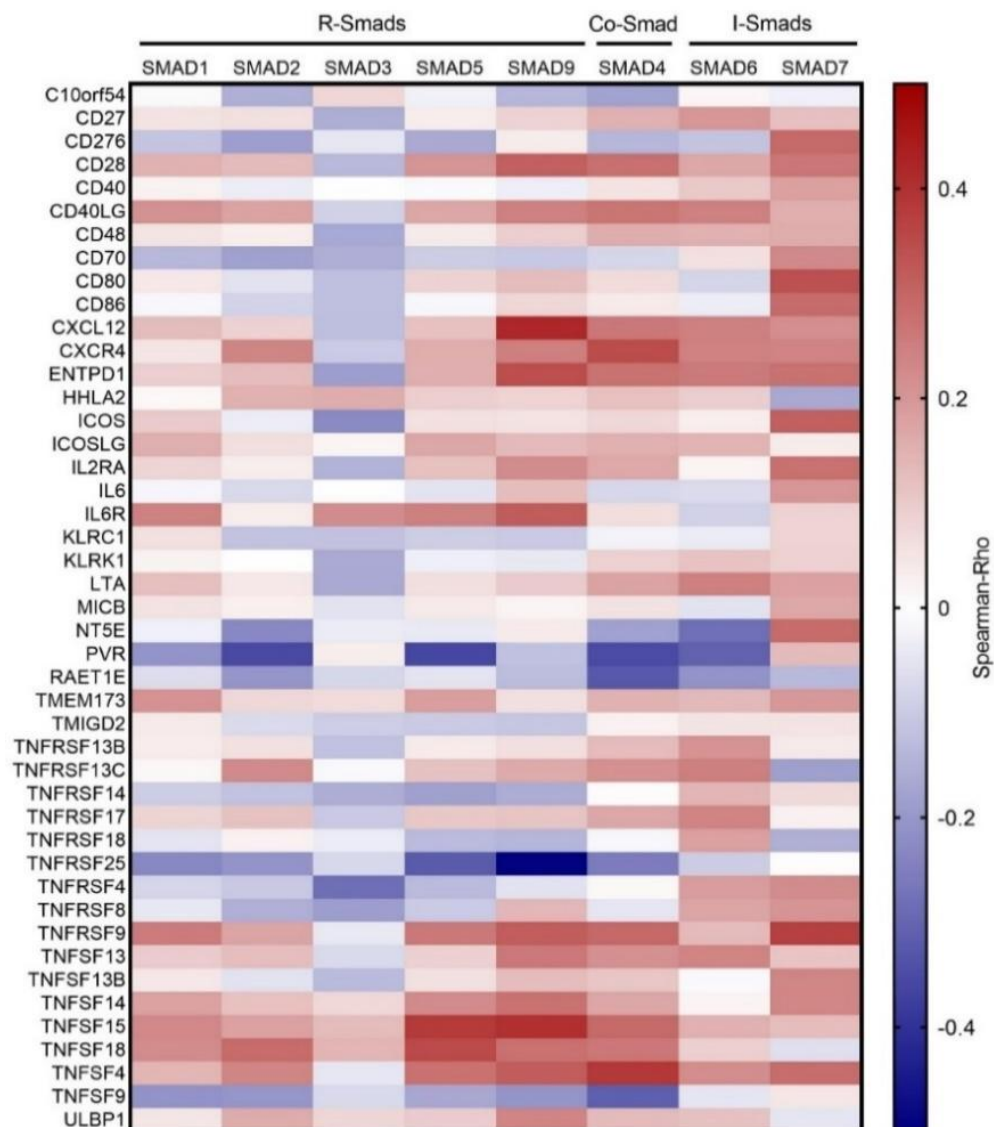


Abbildung 9: Korrelation der Expression der SMAD-Gene mit der Expression von immunstimulatorischen Faktoren

Die Heatmap zeigt die Spearman-Korrelation der R-Smad-, Co-Smad- und I-Smad-Expressionen mit einer Auswahl von immunstimulatorischen Faktoren im Tumorgewebe. Rot: positive Korrelation, blau: negative Korrelation (angegeben als Spearman-Rho).

In Bezug auf die SMAD-Expression und die immuninhibitorischen Faktoren konnten nach Auswertung der Heatmap in **Abbildung 10** ebenfalls hohe Korrelationkoeffizienten für die SMAD7-Expression mit zahlreichen immuninhibitorischen Faktoren gezeigt werden. Wohingegen für die SMAD3-Expression überwiegend negative Korrelationen vorherrschten. Es ließ sich somit feststellen, dass SMAD7 mit einer TMU einherging, in der sowohl immunstimulatorische als auch immuninhibitorische Faktoren hochreguliert waren. Im

Gegensatz dazu konnte in Tumoren mit einer hohen *SMAD3*-Expression eher herunterregulierte immunstimulatorische und immuninhibitorische Faktoren gefunden werden.

Ebenso war zu beobachten, dass der Kinase-Insert-Domain-Rezeptor (*KDR*), das Immun-Checkpointmolekül (*CD96*) und der B- und T-Lymphozyten-Attenuator (*BTLA*) hohe Korrelationen zu fast allen *SMAD*-Genen besaß (**Abbildung 10**). Bemerkenswert waren außerdem die negativen Korrelationen von dem Poliovirus-rezeptorbezogenen-Gen 2 (*PVRL2*) und dem für TGFβ-codierenden *TGFB1*, zu fast allen *SMAD*-Genen, darunter vor allem *SMAD1*, *SMAD2*, *SMAD5*, *SMAD9*, *SMAD4* und *SMAD6*. (**Abbildung 10**).

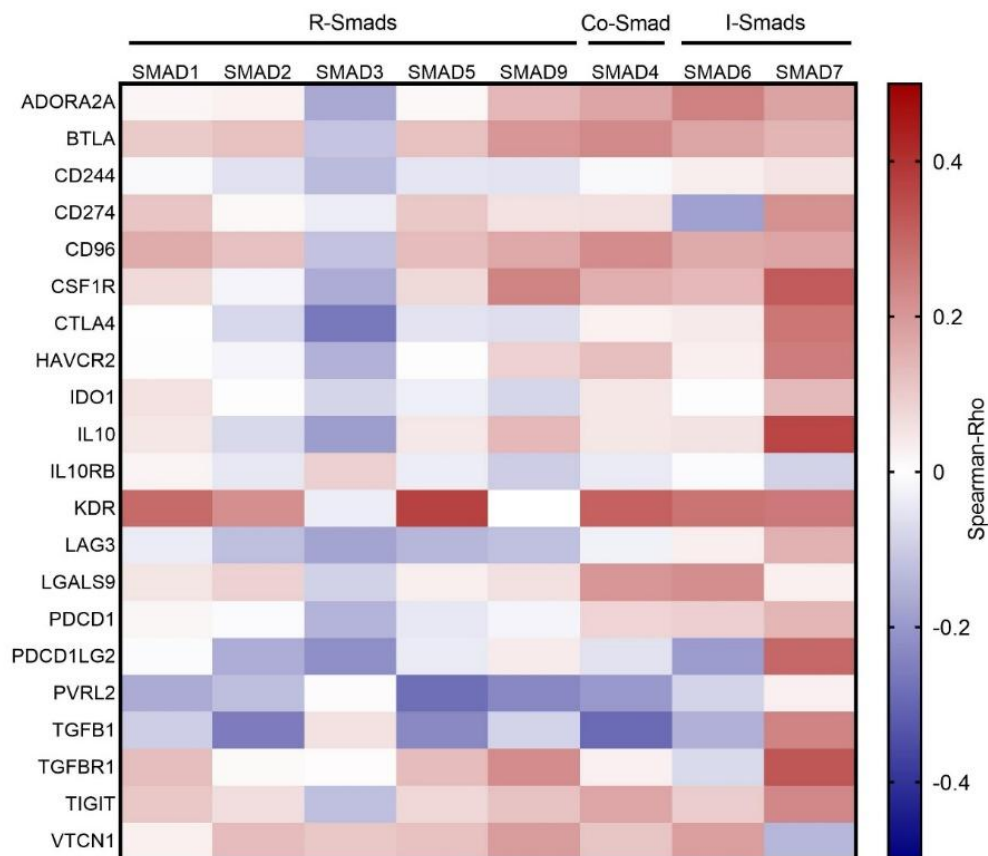


Abbildung 10: Korrelation der Expression der *SMAD*-Gene mit der Expression von immuninhibitorischen Faktoren

Die Heatmap zeigt die Spearman-Korrelation der R-Smad-, Co-Smad- und I-Smad-Expressionen mit einer Auswahl von immuninhibitorischen Faktoren im Tumorgewebe. Rot: positive Korrelation, blau: negative Korrelation (angegeben als Spearman-Rho).

Nach Ansicht der Heatmap, welche die Spearman-Korrelation zwischen den *SMAD*-Expressionen und den verschiedenen Chemokinen zeigte, waren vor allem die hohen Korrelationen für die *SMAD7*-Expression und beinahe allen Chemokinen auffällig. Dagegen korrelierte eine hohe *SMAD3*-Expression negativ mit vielen Chemokinen (**Abbildung 11**). Bei Betrachtung der einzelnen Gene der Chemokine traten *CCL3*, *CCL4*, *CCL5*, *CCL7*, *CCL27*, *CXCL2*, *CXCL10*, *CXCL11*, *XCL1* und *XCL2* hervor, dort war die Korrelation zu der R-Smad-, Co-Smad- und *SMAD6*-Expression jeweils weniger ausgeprägt. Zusammenfassend zeigte sich, dass das I-Smad *SMAD7* in Tumoren mit einer Vielzahl an Chemokinen assoziiert war.

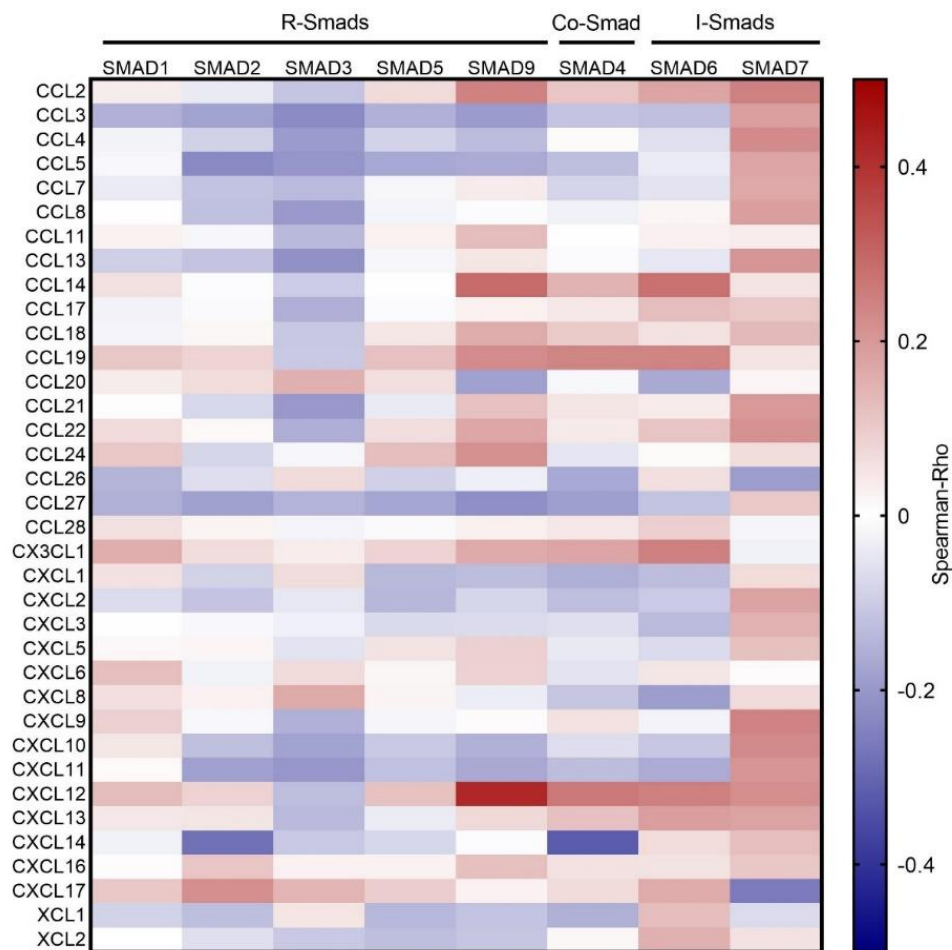


Abbildung 11: Korrelation der Expression der *SMAD*-Gene mit der Expression von ausgewählten Chemokinen

Die Heatmap zeigt die Spearman-Korrelation der R-Smad-, Co-Smad- und I-Smad-Expressionen mit einer Auswahl im Tumorgewebe vorherrschender Chemokine. Rot: positive Korrelation, blau: negative Korrelation (angegeben als Spearman-Rho).

Ein weiteres Ziel war es herauszufinden, ob die *SMAD*-Expression auch einen Einfluss auf die Chemotaxis von Leukozyten hat. So wurden mit Hilfe des TISIDB-Tools 28 Leukozyten untersucht. Hierzu wurden ebenfalls Heatmaps erzeugt, um die Korrelation der *SMAD*-Expression und der Leukozyten-Expression graphisch abzubilden.

Wie bei den immunstimulatorischen Markern war auch bei der Leukozyten-Expression eine hohe Korrelation von *SMAD7* mit zahlreichen Leukozyten zu sehen. Im Gegensatz dazu war eine negative Korrelation von *SMAD3* mit einer Vielzahl an Leukozyten aufzufinden. Daraus geht hervor, dass die Leukozytenanzahl im Tumorgewebe mit hoher *SMAD7*-Expression hochreguliert und mit hoher *SMAD3*-Expression herunterreguliert war.

Wenig ausgeprägte Korrelationen waren bei allen *SMAD*-Genen, mit Ausnahme der *SMAD7*-Expression, und folgenden Leukozyten zu finden: aktivierte CD8-T-Zellen (*Act CD8*), zentrale Gedächtnis CD4-T-Zelle (*Tcm CD4*), Gamma-Delta-T-Zellen (*Tgd*), CD56^{bright} NK-Zellen (*CD56^{bright}*), CD56^{dim} NK-Zellen (*CD56^{dim}*), Monozyten und Neutrophile. Überwiegend hohe Korrelationskoeffizienten dagegen wiesen beinahe alle *SMAD*-Gene in Korrelation mit den aktivierten CD4-T-Zellen (*Act CD4*), den Effektor-Gedächtnis CD4-T-Zellen (*Tem CD4*), den Typ-2-T-Helferzellen (*Th2*), den B-Gedächtniszellen (*Mem B*), NK-Zellen und unreife dendritischen Zellen (IDC) auf (**Abbildung 12**).

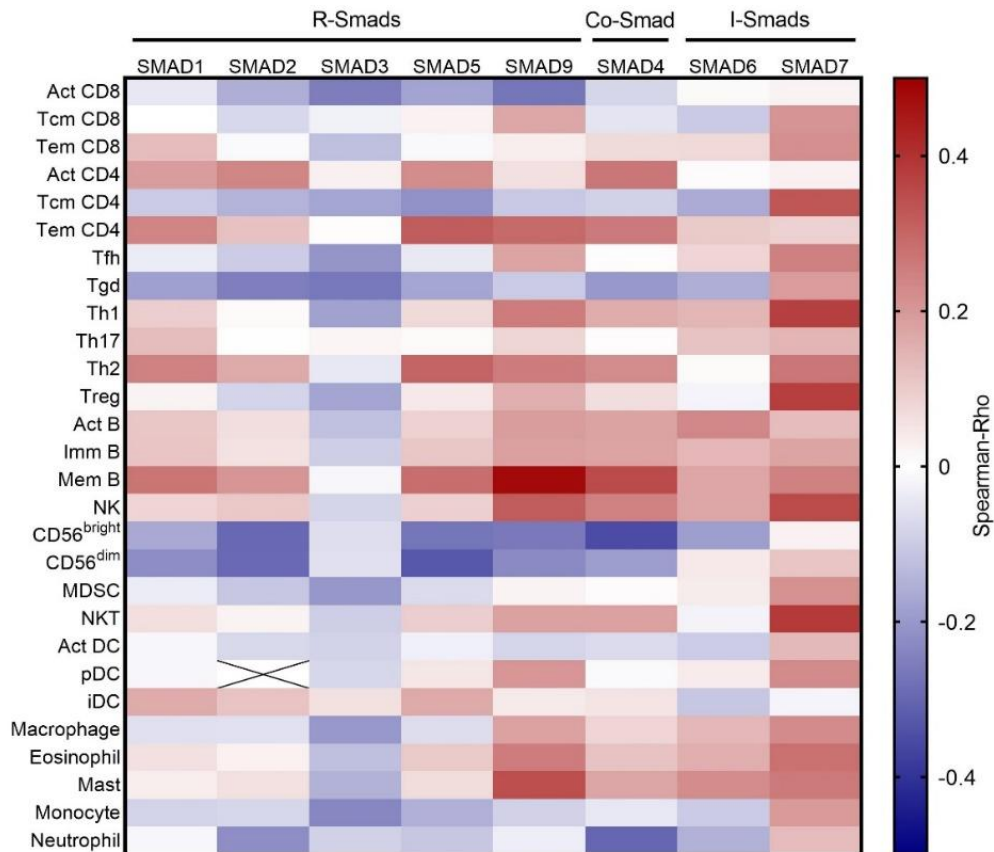


Abbildung 12: Korrelation der Expression der *SMAD*-Gene mit der Expression von ausgewählten Leukozyten

Die Heatmap zeigt die Spearman-Korrelation der R-Smad-, Co-Smad- und I-Smad-Expressionen mit einer Auswahl im Tumorgewebe vorherrschender Leukozyten. Rot: positive Korrelation, blau: negative Korrelation (angegeben als Spearman-Rho).

3.1.5 Korrelationsanalyse mit tumorfördernden Gensignaturen

Zur Überprüfung, ob eine hohe *SMAD*-Expression mit bestimmten tumorfördernden Eigenschaften zusammenhängt, wurden die *SMAD*-Gene mit Hilfe des GEPIA2-Tools mit acht Faktoren der Hallmarks of Cancer, den Markenzeichen von Krebs, korreliert. Zu diesen Markenzeichen gehören folgende Merkmale: die Aufrechterhaltung der proliferativen Signalübertragung und der Verlust von Wachstumssuppressoren, der Widerstand gegen den Zelltod, die Ermöglichung replikativer Unsterblichkeit, die Induktion von Angiogenese, die Aktivierung von Invasion und Metastasierung, eine genomische Instabilität, die Deregulierung des Energiestoffwechsels und das Vorhandensein vesikulationsbezogener Gene.

Insgesamt zeigte die Mehrzahl der *SMAD*-Gene und der tumorfördernden Krebsmarker überwiegend hohe Korrelationskoeffizienten. Dabei fiel die *SMAD2*-, die *SMAD5*- und die *SMAD7*-Expression, vor allem aber die *SMAD1*- und die *SMAD4*-Expression, mit einer stark ausgeprägten Korrelation zu einer Vielzahl der Faktoren der Hallmarks of Cancer auf (**Abbildung 13**). Die *SMAD6*-Expression korrelierte dagegen weniger stark mit den tumorfördernden Markergenen. Die mitochondrialen Komplexe I bis V, welche einen Marker der energetischen Deregulation darstellen, zeigten interessanterweise bis auf den mitochondrialen Komplex II eine negative Korrelation zu beinahe allen *SMAD*-Genen. Andere Faktoren der Hub-Gene wiesen eine nur schwache Korrelation zu den *SMAD*-Genen auf, wie die inflammatorischen Faktoren (inflammatory factors), die Proteolyse-Faktoren (proteolysis), und die Matrix-Metalloproteasen (Matrix metalloproteinases) (**Abbildung 13**).

Zusammengefasst ließ sich also zeigen, dass die Mehrzahl der tumorfördernden Faktoren in der TMU gemeinsam mit den *SMAD1*-, *SMAD2*-, *SMAD4*-, *SMAD5*- und *SMAD7*-Expressionen hochreguliert waren. Dagegen waren die tumorfördernden Faktoren nur geringfügig mit einer hohen *SMAD6*-Expression assoziiert.

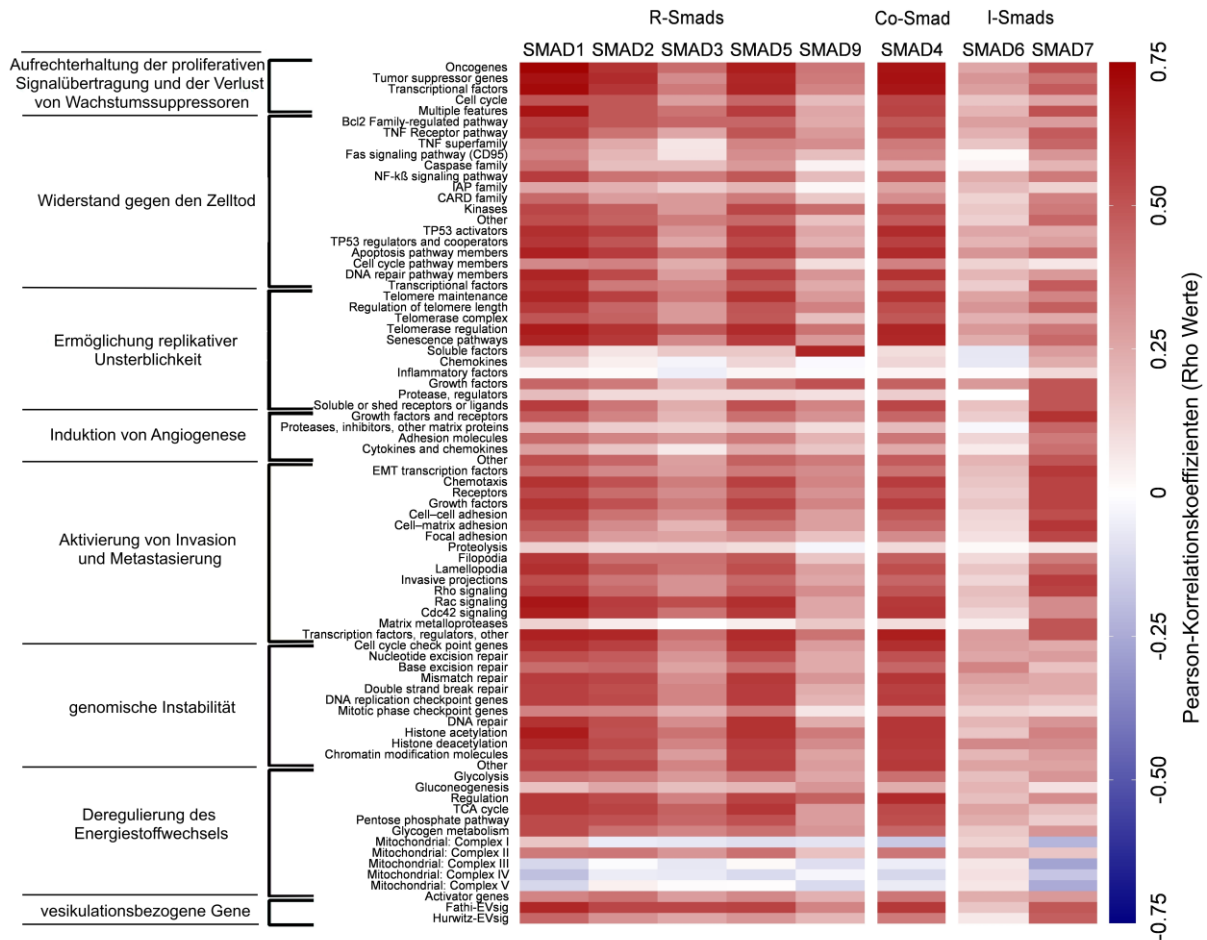


Abbildung 13: Korrelation der Smads mit tumorfördernden Krebssignaturen

Die Heatmap zeigt die Pearson-Korrelation zwischen den R-Smad-, dem Co-Smad- und den I-Smad-Expressionen und den Markenzeichen von Krebs (die Aufrechterhaltung der proliferativen Signalübertragung und der Verlust von Wachstumssuppressoren, der Widerstand gegen den Zelltod, die Ermöglichung replikativer Unsterblichkeit, die Induktion von Angiogenese, die Aktivierung von Invasion und Metastasierung, eine genomische Instabilität, die Deregulierung des Energiestoffwechsels und vesikulationsbezogene Gene). Die Daten wurden mit Hilfe von GEPIA erstellt und stammen aus dem TCGA-Datensatz.

3.2 Die Rolle der Smad3-Proteinexpression

Basierend auf den Ergebnissen der Genebene, welche *SMAD3* als prognostisch relevanten Faktor darstellte, wurde der Fokus in diesem Teil der Arbeit auf die Analyse von Smad3 auf Proteinebene gelegt. Dazu wurden Proben aus Tumorgewebe von Patienten mit HNSCC und Proben aus gesundem Gewebe mittels IHC analysiert (**Abbildung 14**). Neben der Gesamt-Smad3-Expression (T-Smad3) wurde dabei zusätzlich die Expression von phosphoryliertem Smad3 (P-Smad3) untersucht, um

konkret Aussagen zur Aktivität des Signalwegs treffen zu können. Zur Quantifizierung wurde der H-Index von P-Smad3 und T-Smad3 und zusätzlich das Verhältnis von P-Smad3 zu T-Smad3 ermittelt. Die Smad3-Expressionsniveaus von Normalgewebe und Tumorgewebe konnten auf diese Weise verglichen und Korrelationen mit klinischen Parametern wie Geschlecht, Lokalisation, Grade, Stage und TNM-Status herausgearbeitet werden.

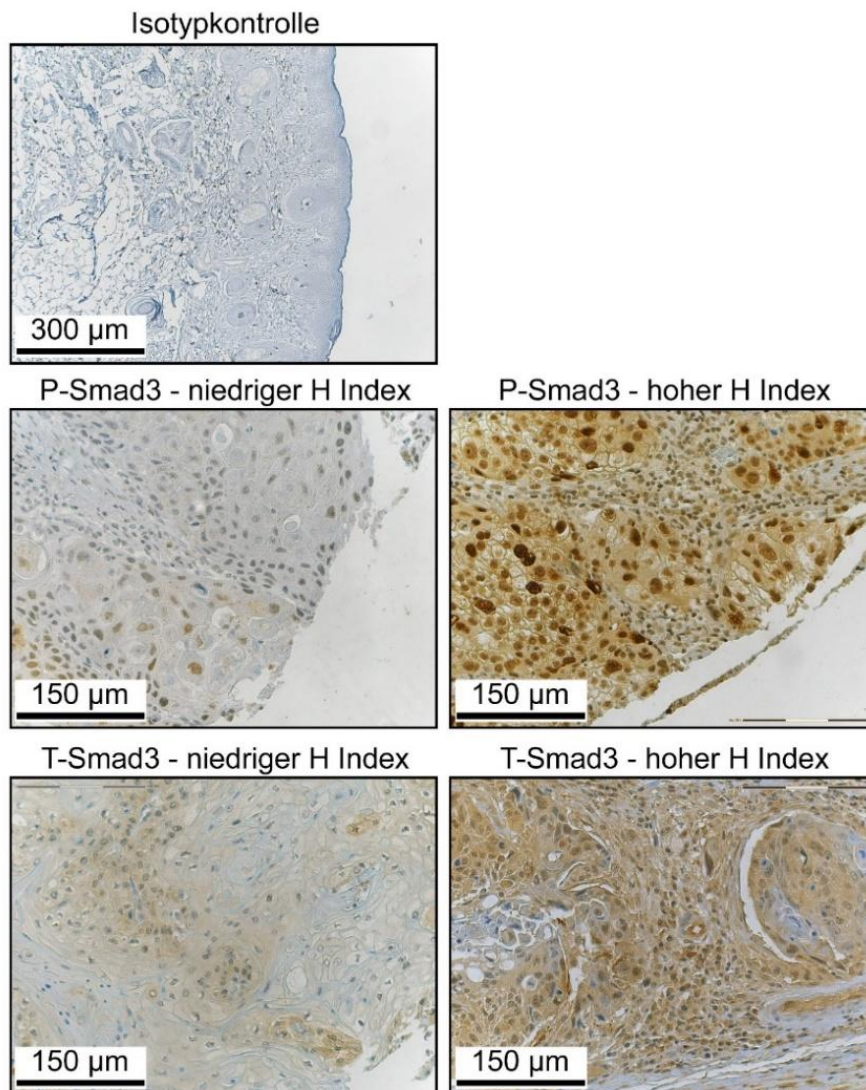


Abbildung 14: Repräsentative immunhistochemische Färbungen des TMAs

Repräsentative immunhistochemische Färbungen der Isotypkontrolle sowie von P-Smad3 und T-Smad3, welche zur Bestimmung des H Index verwendet wurden. Zur Veranschaulichung sind repräsentative Färbungen mit niedrigem und hohem H Index für P-Smad3 und T-Smad3 dargestellt.

3.2.1 Charakterisierung des Patientenkollektivs

Insgesamt wurden Gewebeproben von 40 Personen untersucht, darunter sieben Gewebeproben von gesunden Personen und 33 Gewebeproben von Patienten mit HNSCC, wobei es sich bei drei dieser Proben um gesundes Gewebe aus benachbarten Regionen des Tumors handelte (**Tabelle 3**).

Die HNSCC-Gewebeproben stammten von 26 männlichen Patienten (87 %) und von vier weiblichen Patienten (13 %), die aus dem gesunden Gewebe von acht männlichen (80 %) und von zwei weiblichen (20 %) Patienten. Die Altersgruppe 45-59 Jahre war mit einer Anzahl von 13 Patienten (43,33 %) am häufigsten vertreten, nachfolgend kam die Gruppe mit einem Alter von 60-74 Jahre (9 Patienten; 30 %). In der Altersgruppe 0-44 Jahre befanden sich lediglich 3 Patienten (3 %) und in der Gruppe über 74 Jahre 5 Patienten (16,67 %) (**Tabelle 3**).

Die Tumorproben wurden aus unterschiedlichen Regionen des Kopf- und Halsbereiches entnommen, dabei zum größten Teil aus der Kehlkopfregion (16 Personen, 53,33 %). Des Weiteren wurden drei Gewebeproben (10 %) aus der Zunge untersucht. Jeweils zwei Proben (6,67 %) wurden aus den Bereichen der Wange, der Lippe, des Laryngopharynx und der Nase analysiert und jeweils eine Probe (3,33 %) aus dem Bereich der Gingiva, der Stimmbänder und des Sinus Maxillaris (**Tabelle 3**).

Die Patienten wurden anhand ihrer klinisch-pathologischen Befunde nach dem TNM-Status, dem Grade und der Stage eingeteilt (**Tabelle 3**). Dabei wurden zwei Patienten (6,67 %) in einen T1 Tumor, zehn Patienten (33,33 %) in einen T2 Tumor, acht Patienten in einen T3 Tumor (26,67 %) und 10 Patienten (33,33 %) in einen T4 Tumor kategorisiert. Ein Großteil der untersuchten Patienten (25 Patienten, 83,33%) wies keine Lymphknotenbeteiligung auf (N0), die Patienten mit einer Lymphknotenbeteiligung wurden als N+ zusammengefasst und machten so 16,67 % aus (5 Patienten). Keiner der Patienten wies Fernmetastasen auf (M-Status).

Tabelle 3: Klinisch-pathologische Merkmale, der in dieser Arbeit untersuchten HNSCC-Patienten

Eigenschaften	HNSCC-Patienten (<i>n</i> = 30)	
	<i>N</i>	%
<i>Geschlecht</i>		
Männlich	26	87
Weiblich	4	13
<i>Alter bei Diagnose (Jahre)</i>		
0-44	3	10
45-59	13	43,33
60-74	9	30
≥75	5	16,67
<i>Tumorlokalisationen</i>		
Larynx	16	53,33
Gingiva	1	3,33
Wange	2	6,67
Zunge	3	10
Lippe	2	6,67
Laryngopharynx	2	6,67
Stimmbänder	1	3,33
Nase	2	6,67
Sinus Maxillaris	1	3,33
<i>Tumorausdehnung-</i>		
T1	2	6,67
T2	10	33,33
T3	8	26,67
T4	10	33,33
<i>Regionäre Lymphknotenmetastasen</i>		
N0	25	83,33
N+	5	16,67
<i>Grade</i>		
1	5	17
1-2	2	7

2	13	43
2-3	4	13
3+	6	20
<i>Stage</i>		
I	2	6,67
II	8	26,67
III	7	23,33
IVA	13	43,33

3.2.2 Vergleich von gesundem Gewebe mit Tumorgewebe

Beim Vergleich von Tumorgewebe mit dem gesunden Gewebe fiel auf, dass im Tumorgewebe die Expressionslevel von T-Smad3 ($p < 0,0001$) und P-Smad3 ($p = 0,0069$) stark signifikant erhöht waren (**Abbildung 15 A und B**). Dabei zeigte sich die P-Smad3-Expression im Vergleich zum Tumorgewebe mehr als verdoppelt und die T-Smad3-Expression etwa verdreifacht. Das Verhältnis von P-Smad3 zu T-Smad3 hatte im gesunden Gewebe etwa einen Wert von eins. Dies deutet darauf hin, dass Smad3 vorrangig phosphoryliert vorlag. Im Vergleich zum Tumorgewebe war zwar diesbezüglich kein signifikanter Unterschied zu erkennen, es zeigte sich aber eine vermehrte Dysregulation, welche durch die große Spannweite der Daten für das P-Smad3/T-Smad3 Verhältnis im Tumorgewebe verdeutlicht wurde (**Abbildung 15 C**).

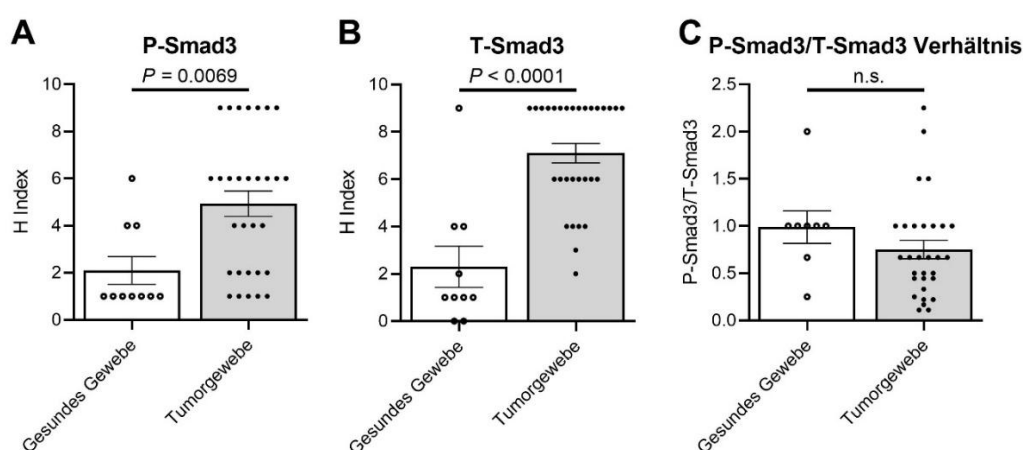


Abbildung 15: Vergleich der P-Smad3- und T-Smad3-Expression im gesunden Gewebe und im Tumorgewebe

Die Auswertung der P-Smad3- und T-Smad3-Expression erfolgte im gesunden Gewebe und im Tumorgewebe mittels IHC. Dabei wurde die Proteinexpression anhand des H Index von P-Smad (**A**), T-Smad3 (**B**) und des Verhältnisses von P-Smad3 zu T-Smad3 verglichen (**C**). Mittelwerte $\pm$ SEM. Die

Daten in **A** und **B** wurden in "TGF- β carrying exosomes in plasma: potential biomarkers of cancer progression in patients with head and neck squamous cell carcinoma" [89] publiziert und mit Erlaubnis von Springer Nature reproduziert.

3.2.3 Geschlechtsspezifische Unterschiede der Tumorproben

Durch Gegenüberstellung von Gewebeproben männlicher und weiblicher Patienten konnte gezeigt werden, dass der Mittelwert des Verhältnisses von P-Smad3 zu T-Smad3 bei den Männern tendenziell höher war als bei den Frauen, wenn auch ohne Signifikanz (**Abbildung 16 C**). Obwohl T-Smad3 bei Männern und Frauen beinahe gleichwertig exprimiert war, war die Expression von P-Smad3 bei den Männern deutlich erhöht (auch hier ohne Signifikanz; **Abbildung 16 A und B**). Dies weist darauf hin, dass im HNSCC-Gewebe von männlichen Patienten vermutlich eine höhere Aktivität des TGF β -Signalweges vorzufinden ist.

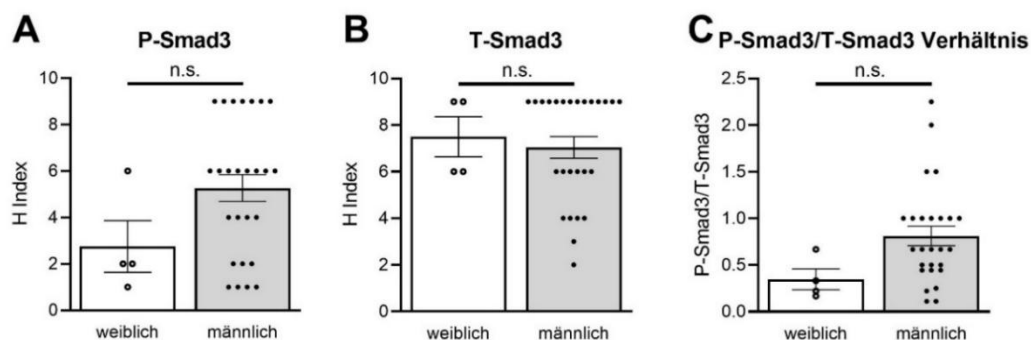


Abbildung 16: Vergleich der Expression von P-Smad3 und T-Smad3 in Tumorproben von männlichen und weiblichen Patienten

Die P-Smad3- und T-Smad3-Expression von männlichen und weiblichen Patienten wurde im Tumorgewebe durch IHC anhand des H Index von P-Smad3 (**A**), T-Smad3 (**B**) und des Verhältnisses von P-Smad3 zu T-Smad3 (**C**) verglichen. Mittelwerte $\pm$ SEM.

3.2.4 Altersabhängige Faktoren in Bezug auf die Tumorphathogenese

Bei Betrachtung der Tumorproben aus den unterschiedlichen Altersgruppen ließen sich keine relevanten Schlüsse ziehen, es traten zudem keine signifikanten Unterschiede auf (**Abbildung 17 A-C**).

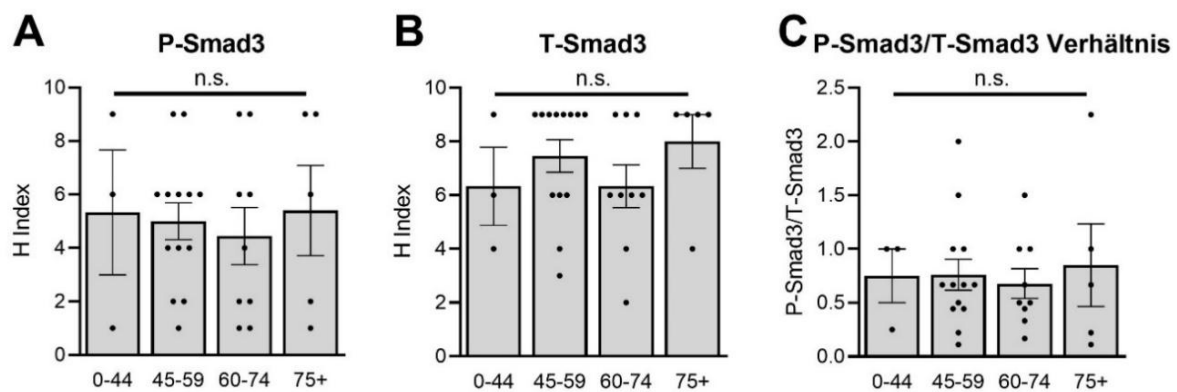


Abbildung 17: Vergleich der Expression von P-Smad3 und T-Smad3 in Bezug auf das Alter der Patienten

Die P-Smad3- und T-Smad3-Expression wurde in verschiedenen Altersgruppen (0-44 Jahre, 45-59 Jahre, 60-74 Jahre und 75+ Jahre) in Tumormustern mittels IHC anhand des H Index von P-Smad3 **(A)**, T-Smad3 **(B)** und des Verhältnisses von P-Smad3 zu T-Smad3 **(C)** verglichen. Mittelwerte $\pm$ SEM.

3.2.5 Analyse der Tumormustern unterschiedlicher Lokalisationen

Nach Analyse der Smad3-Expression in Gewebeproben verschiedener Entnahmestellen konnten keine signifikanten Werte gefunden werden: Das HNSCC-Gewebe von Zunge, Nase und Sinus Maxillaris zeigte eine auffallend geringe P-Smad3-Expression **(Abbildung 18 A)** und das Verhältnis von P-Smad3 zu T-Smad3 war ebenfalls vergleichsweise gering **(Abbildung 18 C)**. Dies deutete darauf hin, dass der TGF β -Signalweg im Tumorgewebe der Zunge, der Nase und des Sinus Maxillaris möglicherweise weniger aktiv ist.

Die Tumormustern von Gingiva, Wange, Lippe und Laryngopharynx hingegen wiesen eine vergleichsweise hohe P-Smad3-Expressionen und gleichzeitig hohe Vergleichswerte (P-Smad3 zu T-Smad3) auf **(Abbildung 18 A und C)**, was dort auf eine hohe Aktivität des TGF β -Signalweges hindeutete.

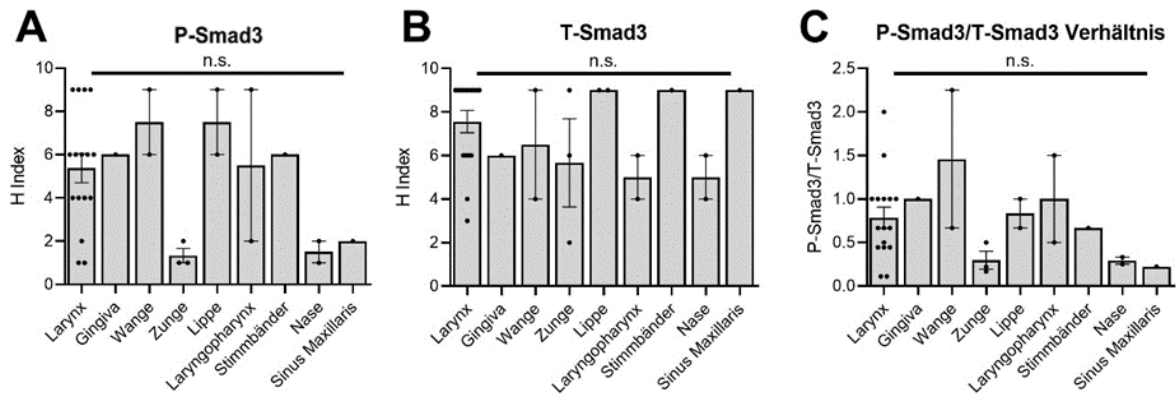


Abbildung 18: Vergleich der Expression von P-Smad3 und T-Smad3 in Bezug auf die Lokalisation des Primärtumors

Die P-Smad3- und T-Smad3-Expression wurde in Tumoren mit unterschiedlichen Lokalisationen durch IHC anhand des H Index von P-Smad3 (**A**), T-Smad3 (**B**) und des Verhältnisses von P-Smad3 zu T-Smad3 (**C**) verglichen. Mittelwerte $\pm$ SEM.

3.2.6 Einfluss der TNM-Klassifikation auf die Tumorpathologie

Die Daten der Tumorgöße zeigten zwar keine statistisch signifikanten Unterschiede, dennoch war hier eine deutliche Tendenz zu erkennen: Die Phosphorylierung von Smad3 nahm mit der Tumorgöße kontinuierlich zu (**Abbildung 19 A**), während die T-Smad3-Expression konstant auf einem hohen Niveau war (**Abbildung 19 B**). In Bezug auf das P-Smad3-T-Smad3-Verhältnis war ebenfalls eine Korrelation mit der Tumorgöße zu erkennen, allerdings konnten zwischen T3 und T4 Tumoren keine Unterschiede beobachtet werden (**Abbildung 19 C**).

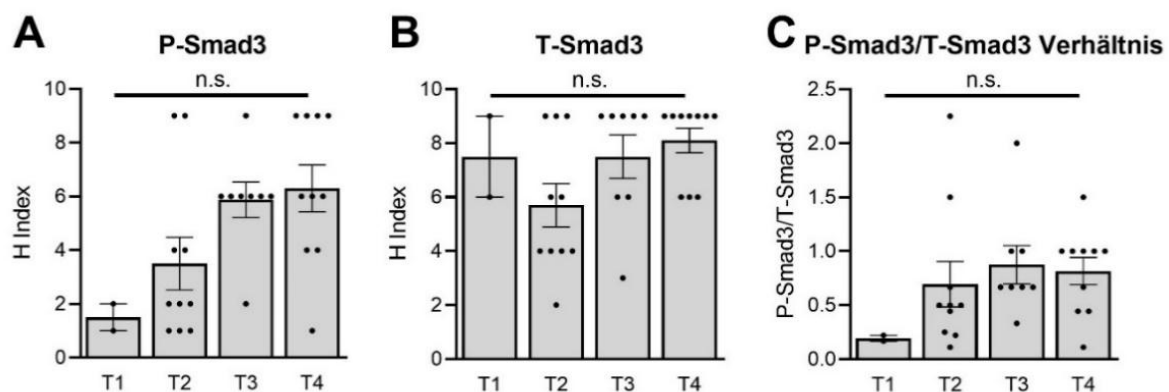


Abbildung 19: Vergleich der Expression von P-Smad3 und T-Smad3 in Bezug auf die Tumorgöße

Die P-Smad3- und T-Smad3-Expression wurde in Tumoren mit den T-Status von T1 bis T4 durch IHC anhand des H Index von T-Smad3 **(A)**, P-Smad3 **(B)** und des Verhältnisses von P-Smad3 zu T-Smad3 **(C)** verglichen. Mittelwerte $\pm$ SEM. Die Daten in **A** und **B** wurden in "TGF β carrying exosomes in plasma: potential biomarkers of cancer progression in patients with head and neck squamous cell carcinoma" [89] publiziert und mit Erlaubnis von Springer Nature reproduziert.

Auch bei der Analyse des Lymphknotenstatus konnten keine signifikanten Unterschiede der Expression von T-Smad3 und P-Smad3 beobachtet werden, Patienten mit Lymphknotenmetastasen (N+) hatten aber tendenziell höhere Expressionslevel beider Marker **(Abbildung 20 A und B)**. Die Mittelwerte des P-Smad3/T-Smad3 Verhältnis waren annähernd gleich und demnach auch nicht signifikant unterschiedlich **(Abbildung 20 C)**.

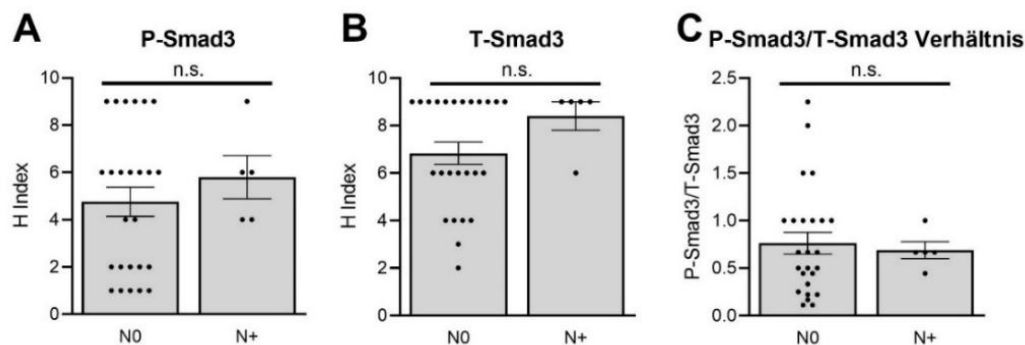


Abbildung 20: Vergleich der Expression von P-Smad3 und T-Smad3 in Bezug auf den Lymphknotenstatus

Auswertung der P-Smad3- und T-Smad3-Expression im Hinblick auf die Lymphknotenbeteiligung durch IHC. Vergleich der Proteinexpression in Patienten mit N0 Status (keine Lymphknotenbeteiligung) und N+ Status (mit Lymphknotenbeteiligung) anhand des H Index von T-Smad3 **(A)**, P-Smad3 **(B)** und des Verhältnisses von P-Smad3 zu T-Smad3 **(C)**. Mittelwerte $\pm$ SEM.

3.2.7 Tumorcharakteristika in Abhängigkeit vom Grading

Für die P-Smad3-Expression konnte bei Patienten mit Tumoren unterschiedlicher Grade keine signifikanten Unterschiede gezeigt werden, insgesamt schien bei dem Tumorgewebe, welche mit einem Grade ≥ 2 klassifiziert wurden, eine verstärkte Phosphorylierung von Smad3 vorhanden zu sein **(Abbildung 21 A)**. Als statistisch signifikant ist der Unterschied der T-Smad3-Expression von Patienten mit einem Grade 1/2 Tumor und einem Grade 2 Tumor hervorzuheben ($p = 0,0409$), so zeigten Patienten mit einem Grade 2 Tumor eine deutlich höhere T-Smad3-Expression als die

mit einem Grade $\frac{1}{2}$ Tumor (**Abbildung 21 B**). Weiterhin lag das Verhältnis von P-Smad3 zu T-Smad3 im Tumorgewebe mit einem Grade $\frac{2}{3}$ und 3 etwa bei einem Wert von eins und ließ damit darauf schließen, dass mit höheren Tumorgrade Smad3 überwiegend phosphoryliert vorliegt (**Abbildung 21 C**).

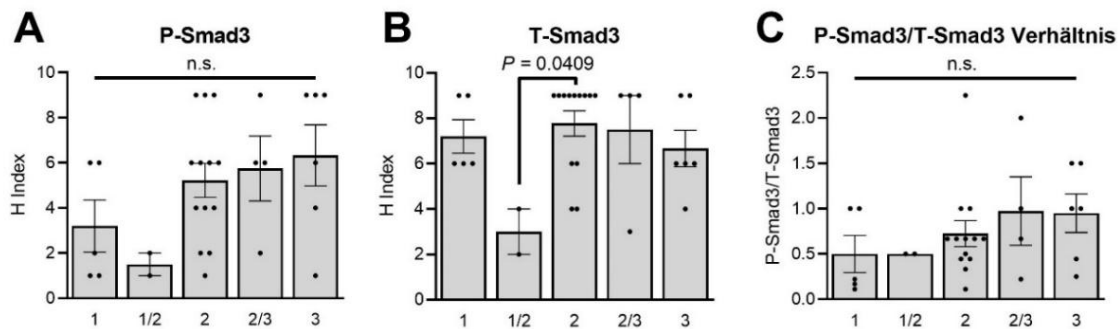


Abbildung 21: Vergleich der Expression von P-Smad3 und T-Smad3 in Tumormustern mit unterschiedlichem Grade

Die P-Smad3- und T-Smad3-Expression wurde von Grade 1-3 im Tumorgewebe des HNSCCs durch ICH anhand des H-Index von P-Smad3 (**A**), T-Smad3 (**B**) und des Verhältnisses von P-Smad3 zu T-Smad3 (**C**) verglichen. Die Werte sind als Mittelwerte angegeben und der Standardfehler des Mittelwerts ist jeweils mit abgebildet.

3.2.8 Auswirkung der Stage auf die Tumorphathogenese

Beim Vergleich von Tumorgewebe unterschiedlicher Stage konnte, wenn auch ohne statistische Signifikanz, festgestellt werden, dass die Phosphorylierung von Smad3 umso größer ist, je weiter der Tumor vorangeschritten ist (**Abbildung 22 A**). Die T-Smad3-Expression wies dagegen bei allen Tumorstages ähnlich hohe Werte auf (**Abbildung 22 B**). Das P-Smad3/T-Smad3-Verhältnis zeigte eine Korrelation mit der Tumorstage I und II. Zwischen Stage II, III und IV ließen sich keine Unterschiede auffinden (**Abbildung 22 C**).

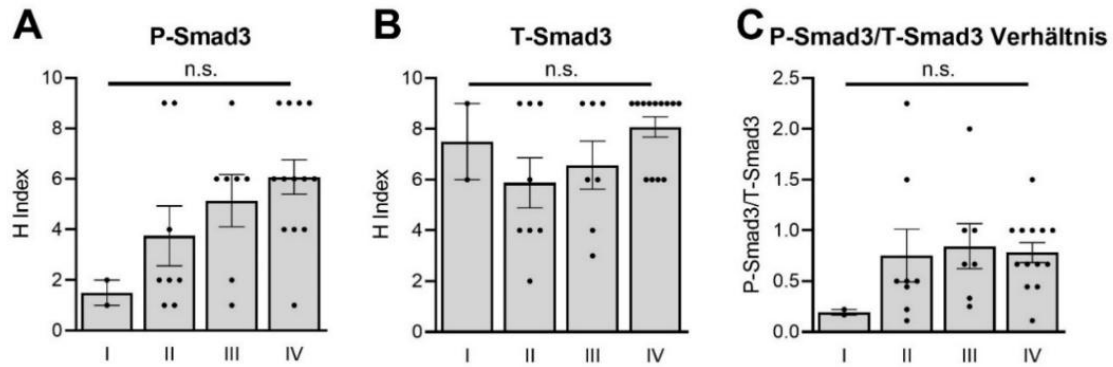


Abbildung 22: Vergleich der Expression von P-Smad3 und T-Smad3 in Tumorproben mit unterschiedlicher Stage

Die P-Smad3- und T-Smad3-Expression wurde von Stage I bis IV im Tumorgewebe des HNSCCs durch IHC anhand des H-Index von P-Smad3 **(A)**, T-Smad3 **(B)** und des Verhältnisses von P-Smad3 zu T-Smad3 **(C)** verglichen. Die Werte sind als Mittelwerte angegeben und der Standardfehler des Mittelwerts ist jeweils mit abgebildet.

4 Diskussion

Der TGF β -Signalweg nimmt in der Karzinogenese von Tumoren eine zentrale Rolle ein [41]. In frühen Stadien wirkt er als Tumorsuppressor, hemmt die Zelltransformation und verhindert die Tumorprogression [58]. In späteren Stadien fördert TGF β dagegen die Tumorprogression, unter anderem durch immunsuppressive Effekte sowie der Stimulation von EMT und Tumorangiogenese [58]. Des Weiteren trägt die TGF β -Signalgebung zu Therapieresistenzen bei [49]. Insgesamt stellt der TGF β -Signalweg somit ein vielversprechendes Ziel in der Tumorthherapie dar, die paradoxe und komplexe Wirkweise des Signalweges schafft allerdings erhebliche Herausforderungen für die Etablierung von sicheren und wirksamen Therapien [49]. Um den TGF β -Signalweg besser zu verstehen und Therapiemöglichkeiten zu optimieren, wurden die Level von TGF β in anderen Tumoren basierend auf unterschiedlichen Methoden quantifiziert [59,66,67]. Eine Herausforderung beim Messen von TGF β als Biomarker liegt allerdings darin, dass TGF β in unterschiedlichen Formen vorliegen kann: aktiv, inaktiv (latent) oder auch verpackt in extrazellulären Vesikeln [90,91]. Ziel dieser Arbeit war die Überprüfung, ob sich die Smad-Proteine (R-Smads, I-Smads oder das Co-Smad) als wichtigste Proteine des nachgeschalteten TGF β -Signalweges, als relevante Biomarker für die HNSCC-Tumorprogression eignen. Dazu wurde überprüft, ob die Smad-Komponenten des TGF β -Signalweges auf Gen- oder Proteinebene mit klinischen Parametern assoziiert sind.

Smad1 gehört zu den BMP-spezifischen R-Smads und kann durch die Komplexbildung mit Smad4 die Signalgebung weiterleiten [46]. In bisherigen Studien konnte bei einer hohen *SMAD1*-Expression, beispielsweise beim multiplen Myelom, ein signifikant kürzeres DFS und OS festgestellt werden [92]. Zudem kann Smad1 das Wachstum und die Metastasierung von Tumoren des kolorektalen Karzinom fördern, indem es die Autophagie der Tumorzellen begünstigt [93]. In einer Studie, welche sich auf das HNSCC bezog, konnte gezeigt werden, dass Smad1 und BMP-4 im Tumor überexprimiert werden und dass deren Expressionen mit einer schlechten Prognose korrelieren [94]. Diese Arbeit konnte ebenfalls die Tendenz einer erhöhten *SMAD1*-Expression im Tumor aufzeigen. Außerdem war eine starke positive Korrelation mit den Hallmarks of Cancer auffällig.

Die Hallmarks of Cancer (Kennzeichen von Krebs) umschreiben allgemein die während der mehrstufigen Entwicklung erworbenen Merkmale von Krebs und beschreiben damit einerseits die Komplexität von neoplastischen Erkrankungen und andererseits sind sie ein Erklärungsansatz für die fortschreitende Progression von malignen Tumorerkrankungen [80]. Eine Korrelation der Smad-Expression mit der vermehrten Expression der Hallmarks of Cancer könnte eine mögliche Rolle der Smad-Proteine in der Tumorprogression aufzeigen [95]. Dieser Zusammenhang lässt sich am deutlichsten für die *SMAD1*-Expression beobachten und lässt darauf hindeuten, dass die Expression mit einem besonders aggressiven Phänotyp assoziiert ist.

Allerdings konnte durch die signifikante *SMAD1*-Abnahme von Stage II auf III auch gezeigt werden, dass mit zunehmender Stage keine kontinuierliche Zunahme der *SMAD1*-Expression zu erwarten ist. Somit kann von der *SMAD1*-Expression nicht auf das im Tumor vorherrschende Krankheitsstadium, der Stage, geschlossen werden.

Smad2 gehört zu den TGF β -spezifischen R-Smads und bildet nach Phosphorylierung einen Komplex mit Smad3 und Smad4, um dann zur Regulierung der Expression spezifischer Gene weiter in den Zellkern zu wandern [42]. Die hier erzielten Ergebnisse zeigten, dass *SMAD2* im Tumor tendenziell leicht hochreguliert war. Mit zunehmenden Lymphknotenbefall und zunehmender Tumor Stage konnte allerdings kein Zusammenhang mit der *SMAD2*-Expression festgestellt werden. Eine hohe *SMAD2*-Expression schien allerdings mit einem niedrigeren DFS zusammenzuhängen (ohne statistische Signifikanz). Darüber hinaus konnte eine hohe positive Korrelation der *SMAD2*-Expression und den Hallmarks of Cancer erfasst werden. Insgesamt war diese aber etwas geringer ausgeprägt als die oben beschriebene Korrelation mit der *SMAD1*-Expression. Mangone *et al.* stützten die hier beobachteten Ergebnisse mit ihrer Analyse der Smad2-Expression im HNSCC, indem sie zeigen konnten, dass eine geringe Smad2-Expression mit einer guten Prognose verbunden ist [96]. Eine weitere Studie konnte dies im Gliom bestätigen, da Patienten mit schlechter Prognose eine hohe Smad2-Expression aufwiesen [97].

Smad3: In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass sowohl bei der Genexpression von *SMAD3* im HNSCC-Gewebe als auch bei der Proteinexpression von Smad3 eine Überexpression vorhanden war. Außerdem konnte anhand von

Kaplan-Meier-Kurven herausgearbeitet werden, dass eine hohe *SMAD3*-Expression mit einem signifikant verkürztem Gesamtüberleben einherging. Diese Beobachtungen könnten damit übereinstimmen, dass Männer, von denen generell eine niedrigere Überlebensrate bekannt ist [3], vermutlich eine höhere P-Smad3-Expression im Tumorgewebe aufweisen.

In bisherigen Studien konnten in anderen Tumoren ähnliche Beobachtungen im Hinblick auf Smad3 gemacht werden: Es wurde beispielsweise in Lungenkrebsgeweben und kultivierten Tumorzellen beobachtet, dass Smad3 hochreguliert war [98]. Zudem konnte festgestellt werden, dass Smad3 das Fortschreiten von Lungenkrebs fördern kann [98]. Ein verkürztes Gesamtüberleben im Zusammenhang mit einer erhöhten Smad3-Expression konnte auch von Kim *et al.* durch IHC in Magenkarzinomgeweben bestätigt werden [99]. Außerdem konnten sie zeigen, dass eine positive Smad3-Expression mit einem diffusen Typ, einer schlechteren histologischen Differenzierung, einem höheren AJCC-Stadium und häufigeren Lymphknotenmetastasen assoziiert ist [99]. Beim dukalen Adenokarzinom des Pankreas konnte ebenfalls ein Zusammenhang von einer hohen *SMAD3*-Expression mit einer größeren Tumorausdehnung, einem höheren Tumorgrad und vermehrten Lymphknotenmetastasen festgestellt werden [100]. Dies konnte auch im HNSCC-Gewebe in dieser Arbeit beobachtet werden, allerdings ohne eine statistische Signifikanz: Die P-Smad3-Konzentration schien in Tumorproben von Patienten mit einer Lymphknotenbeteiligung und zunehmender Stage (ohne statistische Signifikanz) erhöht zu sein. Die T-Smad3-Expression und auch die *SMAD3*-Expression wies dagegen keinen Zusammenhang mit der Tumorstage und die T-Smad3-Expression wies keinen Zusammenhang mit der Tumorgrade auf. Insgesamt zeigte sich also die Tendenz, dass die Aktivierung des TGF β -Signalweges, abgelesen an dem phosphorylierten Smad3, mit zunehmenden Lymphknotenbefall und zunehmender Stage ansteigt. Somit könnte die Quantifizierung von P-Smad3 im Gegensatz zur Quantifizierung von T-Smad3 geeigneter sein, um eine Aussage zum Krankheitsstadiums des Tumors zu treffen.

Des Weiteren konnte in dieser Arbeit herausgefunden werden, dass *SMAD3* eine eher geringe Korrelation mit Immunstimulatoren, Immunsinhibitoren, Chemokinen und Leukozyten aufweist. Chemokine gehören dabei zu den Zytokinen und sind für die Chemotaxis und vor allem für die Aktivierung von Immunzellen von großer Bedeutung [101,102]. So konnte in der Arbeit von Huang *et al.* festgestellt werden, dass die

Chemokine CXL9, CXL10, CXL11 und CCL5 Immunzellen bei einem HNSCC positiv regulieren und somit einen „Immun-heißen“ Phänotyp herbeirufen können [102].

Ist die *SMAD3*-Expression hochreguliert, wird nach den hier ermittelten Daten die Immuninfiltration gering sein, was auf einen Immunzellausschluss im Tumorgewebe, bzw. einen „kalten“ Tumor, hinweisen kann [103]: In vorherigen Studien, welche die Immuninfiltration im HNSCC untersuchten, konnten „immunreiche“ Tumore, vor allem mit hohem Spiegel an tumorinfiltrierenden Lymphozyten (TIL), CD8⁺- und CD4⁺-T-Zellen und NK-Zellen mit einem längeren Überleben und die Infiltration mit zytotoxischen T-Zellen konnte mit einer geringeren Rezidivrate in Verbindung gebracht werden [27]. Zusätzlich konnte in weiteren Studien herausgefunden werden, dass die Prognose und das Ansprechen der Therapie bei Patienten mit einem HNSCC dort erhöht war, wo ein hoher Gehalt an myeloischen DC zu finden war und zugleich eine erhöhte Anzahl an TIL [104,105]. Auch bei einer Analyse der Immunmodulatoren von Brustkrebs konnte eine niedrige Expression von Immunstimulatoren und Immuninhibitoren (darunter *CD27*, *ICOS*, *PD-1*, *TIM-3*, *LAG3*, *PD-L1*, *CTLA4*, *PD-L2*, *TIGIT* und *IDO1*) in Verbindung mit einer schlechten Prognose gebracht werden [106].

In dieser Arbeit konnte ebenfalls gezeigt werden, dass eine hohe *SMAD3*-Expression, welche mit einer geringen Immuninfiltration einhergeht, ein geringeres OS aufzeigt.

Dabei sollte allerdings beachtet werden, dass in vorherigen Studien gezeigt werden konnte, dass nicht alle Leukozyten die gleiche Wirkung auf den Tumor haben: So kann sich zum Beispiel eine hohe Anreicherung von Treg-Zellen und Makrophagen günstig für den Tumor auswirken [49]. Die Heatmap der *SMAD3*-Expression und der tumorfördernden Krebssignaturen zeigte im Vergleich zu den anderen Smads eine eher geringere Korrelation. Daher kann man darauf schließen, dass das geringere OS bei einer hohen *SMAD3*-Expression zwar nicht durch die hier betrachteten Hallmarks of Cancer beschrieben werden konnte, dafür aber durch die obengenannten immunregulatorischen Prozesse.

Kritische Betrachtung bezüglich der Untersuchung von Smad3:

Nach Beurteilung der Aussagekraft der bei der Proteinanalyse aufgeführten Parameter P-Smad3, T-Smad3 und P-Smad3/T-Smad3, lässt sich wie oben bereits genannt P-Smad3 als guter Marker zur Quantifizierung des aktivierten TGFβ-Signalweges nutzen.

Bei der Untersuchung von Smad3 auf Proteinebene wäre eine größere Patientenkohorte mit gleicher Verteilung der Entnahmestellen sinnvoll, um auch die Untergruppen des HNSCCs gut miteinander vergleichen zu können. Die hier ersichtliche Tendenz, dass Wange und Lippe mit hohen P-Smad3 und einem hohen P-Smad3 zu T-Smad3-Verhältnis einhergehen, passt interessanterweise dazu, dass gerade die Lippen- und Mundhöhlenkarzinome mit hohen Todesraten übereinstimmen [1], was mit der hier beobachteten hohen TGF β -Aktivität in Korrelation stehen könnte. Dass insgesamt eine Heterogenität zwischen verschiedenen Lokalisationen des HNSCCs besteht, wurde schon von Mangone *et al.* beobachtet [96].

Smad5 gehört, wie Smad1 zu den BMP-spezifischen R-Smads [107]. Studien zu der Wirkung von Smad5 im Zusammenhang mit Neoplasien gibt es kaum. Hier konnte eine Überexpression von *SMAD5* im Tumor vermutet werden und eine hohe Korrelation der *SMAD5*-Expression und der Expression einer Vielzahl tumorfördernder Marker festgestellt werden. Dies gibt Anlass zu weiteren Studien, welche die Smad5-Expression genauer untersuchen.

Smad9 zählt ebenfalls zu den R-Smads und wird durch den BMP-Pfad reguliert [47]. Smad9 wird in einigen Datenbanken auch als Smad8 bezeichnet, was die Analyse von Smad9 erschwert [108]. In dieser Arbeit schien *SMAD9* im Tumor herunterreguliert zu sein. Es zeigte sich außerdem eine geringe Korrelation zu den tumorfördernden Markern, somit könnte die Smad9-Expression insgesamt mit einem niedrig malignen Phänotyp des Tumors assoziiert sein. Weitere Studien zu Smad9 und anderen Tumoren gibt es bislang kaum. Diese wären sinnvoll, um eine stärkere Aussagekraft zu Smad9 als Biomarker treffen zu können.

Smad4 gilt als gemeinsamer Mediator und kann zur Signalweiterleitung Komplexe mit den R-Smads bilden [42]. In bisherigen Studien wurde häufig von einem Smad4/*SMAD4*-Verlust, der zur Tumorprogression des HNSCCs beiträgt, berichtet [109–111]. Auch in dieser Arbeit konnte die Tendenz beobachtet werden, dass *SMAD4* im Tumor im Vergleich zum Normalgewebe herunterreguliert war. Mit zunehmender Stage und Lymphknotenbeteiligung konnte allerdings kein signifikanter Unterschied ermittelt werden. Eine geringere *SMAD4*-Expression lieferte nach den hier ermittelten Daten zwar keinen Hinweis auf den Tumorstatus, dafür aber auf die

Tumoraggressivität, da eine positive Korrelation der *SMAD4*-Expression und einer Vielzahl tumorfördernder Marker beobachtet werden konnte. Allerdings schien eine hohe *SMAD4*-Expression mit geringeren DFS assoziiert zu sein, weshalb auch hier weitere Analysen interessant wären.

Smad6 gehört zu den BMP-spezifischen Inhibitoren des TGF β -Signalwegs [112]. Smad6 konkurriert dabei mit dem aktivierten Smad1 um die Bindung an Smad4 und inhibiert die BMP-Signalgebung [112]. Zu Smad6 wurden bislang nur wenige Studien durchgeführt, welche die Expression im Zusammenhang mit Krebs überprüfen. Die bisher durchgeführten Studien zeigten teilweise widersprüchliche Ergebnisse: Im Zusammenhang mit Brustkrebs konnte eine hohe Smad6-Expression mit einem erhöhten Metastasierungsrisiko in Verbindung gebracht werden [113]. Mangone *et al.* konnten dagegen herausarbeiten, dass eine hohe Smad6-Expression mit einer guten Prognose einhergeht [96]. Dies konnte in dieser Arbeit ebenfalls gezeigt werden: Bei einer hohen *SMAD6*-Expression konnte sowohl ein signifikant längeres DFS, als auch ein längeres OS, wobei die Werte für das OS dicht an der Signifikanzschwelle lagen, festgestellt werden. Die *SMAD6*-Expression war zudem im Tumorgewebe hochreguliert, allerdings ohne statistische Signifikanz. Die *SMAD6*-Expression stand in keinem starken Zusammenhang mit der Immunzellinfiltration. Dafür zeigte die Heatmap, welche die Korrelation der Smad-Expression und der Expression der Hallmarks of Cancer abbildete, für *SMAD6* eine auffallend geringe Korrelation, was dafürspricht, dass eine hohe *SMAD6*-Expression bei weniger aggressiven Tumoren auftritt. Dies wiederum deckte sich mit der Beobachtung, dass eine hohe *SMAD6*-Expression mit einem signifikant längeren DFS korrelierte.

Zusammenfassend stellt sich Smad6 als ein potenzieller prognostischer Biomarker für einen positiven Krankheitsverlauf dar. Es ist weiterhin zu prüfen, ob als zusätzliche Therapie von HNSCC-Patienten die Modulation der *SMAD6*-Expression, beispielsweise im Rahmen einer Gentherapie, sinnvoll ist.

Smad7 zählt wie Smad6 zu den inhibitorischen Smads und reguliert die Rezeptoren der TGF β -Familie negativ [112], indem er an den TGF β -Rezeptor bindet und die TGF β -assoziierte Smad-Signalübertragung verhindert [114]. Damit ist Smad7 in der Lage die Tumorprogression zu beeinflussen, indem es die durch TGF β induzierte tumorfördernde Mikroumgebung hemmt [115]. Smad7 wurde im

Zusammenhang mit unterschiedlichen Krebsarten, wie Brustkrebs oder Leukämie, vor allem aber dem CRC untersucht, deren Ergebnisse allerdings sehr widersprüchlich sind [115]. Eine aktuelle Metaanalyse von Xiao *et al.* konnte zeigen, dass der *SMAD7*-Polymorphismus rs4939827 das CRC-Risiko senken kann, rs4464148 und rs12953717 dagegen das Risiko erhöhen können [115]. Bei Betrachtung der Heatmap der Expression von *SMAD7* und der Expression der immunstimulatorischen und immuninhibitorischen Faktoren, der Chemokinen und der Leukozyten zeigte sich in dieser Arbeit folgendes Ergebnis: *SMAD7* wies mit allen genannten Faktoren eine hohe Korrelation auf. *Smad7* zeigt sich somit als ein aussagekräftiger Biomarker, da eine erhöhte *SMAD7*-Expression auf eine hohe Immunzellinfiltration schließen lässt, was auf einen „heißen“ Tumor hindeuten kann [103]. Auffällig war ebenfalls die hohe Korrelation von der *TGFB1*- und der *SMAD7*-Expression. Dies passt zu dem Ergebnis von Nakao *et al.*, dass eine erhöhte *SMAD7*-Expression in sofortiger Reaktion von TGFβ induziert werden kann, womit ein enger zeitlicher Zusammenhang besteht [116]. Die Kaplan-Meier-Kurve, die in dieser Arbeit das OS in der High- und Low-*SMAD7*-Gruppe abbildete, gab einen Hinweis auf ein besseres OS in der High-*SMAD7*-Gruppe, jedoch ohne statistische Signifikanz. Bei Betrachtung der Pearson-Korrelation von *SMAD7* mit den Hallmarks of Cancer fiel auf, dass die *SMAD7*-Expression in bestimmten Bereichen, wie bei der Angiogenese-Induktion und der Aktivierung von Invasion und Metastasierung, eine hohe Korrelation aufwies. Andere Marker, wie die Deregulation von zellulärer Energie und die Genominstabilität präsentierten eine eher geringe Korrelation. Es lässt sich zusammenfassend festhalten, dass *SMAD7* einen starken Einfluss auf die Immunzellinfiltration hatte, dafür aber weniger zu der Tumoraggressivität aussagen konnte. Die Ergebnisse legen somit nahe, dass *SMAD7* ein Biomarker für einen positiven Verlauf sein kann, welcher sich vor allem in einem hohen Spiegel an immunmodulatorischen Faktoren, Leukozyten und Chemokinen zeigt.

Zusammenfassend konnten im Rahmen der Arbeit wichtige Informationen zum Tumorgeschehen gesammelt werden:

- Eine *Smad3*-Überexpression sowie eine niedrige *Smad6*-Expression sind potenzielle prognostische Biomarker für ein schlechteres Überleben von HNSCC Patienten.

- Die Analyse der Expression von Smad7 und Smad3 könnte von einer hohen richtungsweisenden Bedeutung sein, um eine Aussage bezüglich der Immunmikroumgebung des HNSCCs treffen zu können. Dies könnte besonders im Hinblick auf die Anwendung einer Immuntherapie relevant sein.
- Eine Aussage zur Aggressivität des Tumors könnte durch die Analyse der Expressionsmuster von Smad1, Smad5 und Smad4 getroffen werden

Limitationen dieser Arbeit:

In dieser Arbeit wurden bis auf Smad3 alle Smad-Proteine nur auf Genebene durch eine Datenbankanalyse ohne weitere Validierung untersucht. Um die hier erhaltenen Ergebnisse zu validieren, sind weitere Untersuchungen der Proteinexpression in HNSCC-Gewebeproben zum Beispiel mit Hilfe von IHC sinnvoll. Eine weitere Limitierung ist, dass die TCGA-Daten aus einem großen Pool verschiedener HNSCC-Proben gewonnen wurden, die von unterschiedlichen Kliniken beigesteuert wurden. Folglich wäre es sinnvoll in weiterführenden, standardisierten Studien die obigen Ergebnisse anhand einer eigenen, gut definierten Patientenkohorte zu validieren.

Wie bereits erwähnt, war die Patientenanzahl dieser Arbeit für die Proteinebene sehr begrenzt. In einer umfangreicheren Patientenkohorte könnten vermutlich auch für die Tumorgröße und die Tumorstage signifikante Ergebnisse erzielt werden.

Die Analyse der Smad-Expression mittels IHC ist eine geeignete Methode für die Ermittlung einer Prognose für den Patienten und für die Planung einer entsprechenden Therapie. Allerdings ist eine Verlaufskontrolle nur bedingt möglich, da jedes Mal eine Tumorbiopsie notwendig ist. Ein neues Verfahren, welche eine invasive Biopsie umgeht, ist die Flüssigbiopsie (Liquid Biopsy; [117]). Dabei werden Blut oder andere Körperflüssigkeiten entnommen, um zirkulierende extrazelluläre Nukleinsäuren (zellfreie DNA), zirkulierende Tumor-DNA, zirkulierende Tumorzellen oder extrazellulären Vesikeln (hierbei insbesondere vom Tumor ausgeschüttete extrazelluläre Vesikel – TEX) zu isolieren [118,119]. TEX lassen sich in allen Körperflüssigkeiten von Krebspatienten finden, geben den Inhalt von Krebszellen wieder und haben damit eine hohe Aussagekraft auf die Diagnose, Prognose und Therapieüberwachung [119]. Weitere Untersuchungen der Komponenten von TEX und hierbei insbesondere die Bestandteile des TGF β -Signalwegs sind sinnvoll, um

schließlich die Informationen, die die Smad-Proteine liefern, in der Tumorthherapie optimal anwenden zu können.

Außerdem ist zu beachten, dass die Smad-Proteine zwar einen großen Teil des TGF β -Signalwegs regulieren, es aber auch TGF β -stimulierte Signalantworten gibt, die unabhängig von den Smads ablaufen können [120].

Zudem konnte in dieser Arbeit herausgefunden werden, dass vermutlich auch der BMP-Weg, welcher durch Smad1, Smad5 und Smad6 vermittelt wird, einen Einfluss auf die Karzinogenese hat. Daher ist es weiterhin wichtig neben dem hier erörterten TGF β -Weg auch den BMP-Weg genauer zu analysieren. Untersuchungen des BMP-Weges in Bezug auf Krebs gibt es bislang nur wenige und diese sind bislang widersprüchlich [44].

5 Zusammenfassung

Ziele: Der TGF β -Signalweg wurde bereits in einigen Studien der Krebsprogression des HNSCCs erforscht, die Rolle der nachgeschalteten Smad-Proteine wurde dabei allerdings weniger betrachtet. Ziel dieser Arbeit war es daher einen Überblick über die Bedeutung der einzelnen Smad-Proteine im Hinblick auf die Tumorprogression zu geben und nachzuweisen, ob sich die Smad-Proteine aufgrund von Korrelationen zu bestimmten Tumoreigenschaften als nützliche Biomarker für die Tumorthherapie eignen.

Methoden: Um dies zu überprüfen, wurden in dieser Arbeit zunächst verschiedene Datenbanksysteme verwendet, um die Genexpression von Smad-Familienmitgliedern bei einem HNSCC in Verbindung mit klinischen Parametern zu analysieren. Da sich die *SMAD3*-Expression auf Genebene als signifikant und aussagekräftig herausstellte, wurde weiterhin die T-Smad3- und P-Smad3-Konzentration in Gewebeproben von HNSCC-Patienten mittels IHC analysiert.

Ergebnisse: Im Tumorgewebe zeigte sich die Tendenz einer Hochregulation der *SMAD1*-, *SMAD2*-, *SMAD3*-, *SMAD5*-, *SMAD4*-, *SMAD6*- und *SMAD7*-Expression. Die *SMAD9*-Expression schien dagegen herunterreguliert zu sein. Des Weiteren fiel vor allem die *SMAD3*-Expression mit einem kürzeren OS bei hoher Expression und die *SMAD6*-Expression mit einem längeren DFS bei hoher Expression auf. Die *SMAD6*-Expression zeigte zusätzlich eine geringe Korrelation zu den tumorfördernden Gensignaturen, den Hallmarks of Cancer, auf. Außerdem war die hohe Korrelation der *SMAD7*-Expression sowohl zu den immunmodulatorischen Faktoren und den Chemokinen als auch zu den Leukozyten beachtenswert. Als weitere Auffälligkeit zeigte sich die *SMAD1*- und *5*- Expression mit einer hohen Korrelation zu den Hallmarks of Cancer.

Schlussfolgerung: Zusammenfassend konnte mit dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Bestimmung der Smad-Expression als Biomarker wichtige Hinweise auf das Tumorgeschehen des HNSCC liefern kann, welche somit für die Diagnose, Behandlung und die Prognose des Patienten wichtige Anhaltspunkte aufzeigen könnten. Weitere experimentelle Studien zu den Smad-Proteinen als Biomarker können hier zielführend sein.

6 Anhang

6.1 Abkürzungsverzeichnis

Act CD4.....	engl. Activated dendritic cell
Act CD8.....	engl. Activated CD8 T cell
AJCC	engl. American Joint Committee on Cancer
ASO	Antisense-Oligonukleotid
ATP	Adenosintriphosphat
BCL2L.....	engl. Bcl-2-like protein
BMP	engl. Bone Morphogenetic Protein
BTLA.....	B- und T-Lymphozyten-Attenuator
bzw.....	beziehungsweise
CAFs.....	engl. cancer-associated fibroblasts
CARD.....	engl. caspase activation and recruitment domain
CD	engl. Cluster of Differentiation
CD56 ^{bright}	engl. CD56 bright natural killer cell
CD56 ^{dim}	engl. CD56dim natural killer cell
CDK	Cyclin-abhängige Kinase
Co-Smad	engl. common-mediator-Smad
CT.....	Computertomografie
DAPK	engl. death-associated protein kinase
DCs	Dendritische Zellen
DFS.....	engl. Disease Free Survival, tumorfreies Überleben
DNA	engl. deoxyribonucleic acid
DOI.....	engl. depth of invasion
EGFR.....	engl. epidermal-growth-factor-receptor
ELISA.....	engl. enzyme-linked immunosorbent Assay
EMT	engl. epithelial-mesenchymal transition
ENE.....	engl. extranodal extension, extranodales Wachstum
<i>et al.</i>	lat. et alii, und andere
EZM	extrazelluläre Matrix
GARP.....	engl. glycoprotein-A-repetitions-predominant
GDF	engl. Growth differentiation factor
GEPIA.....	engl. Gene-Expression-Profiling-Interactive-Analysis
GS-Domäne.....	Glycin-Serin reiche Domäne
GTP.....	Guanosintriphosphat
HNSCC.....	engl. Head and Neck Squamous Cell Carcinoma
HPV	Humane Papillomviren
IAP	engl. inhibitors of apoptosis
ICI.....	Immun-Checkpoint-Inhibitoren
IDC	eng. Immature dendritic cell
IgG	Immunglobulin G
IHC.....	Immunhistochemie
IL.....	Interleukin
I-Smad.....	inhibitorisches Smad
KDR	engl. Kinase Insert Domain Receptor
LAP	engl. latency-associated protein
LTBP	engl. latent-TGF-beta-binding-protein

Mem B	engl. Memory B cell
MMP	Matrix-Metalloproteasen
mRNA	engl. messenger ribonucleic acid
MRT	Magnetresonanztomographie
n.s.	nicht signifikant
NF-kappa-B	engl. nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
NT5E	5'-Nucleotidase Ecto
OS	engl. Overall Survival, Gesamtüberleben
PCR	engl. polymerase chain reaction, Polymerase-Kettenreaktion
PD-1	engl. Programmed Cell Death Protein 1
PD-L1	Programmed Cell Death 1 Ligand 1
PH-Wert	lat. pondus hydrogenii, Potential des Wasserstoffs,
P-Smad	phosphoryliertes Smad
PVR	Poliovirus-Rezeptor
PVRL2	Poliovirus- rezeptorbezogenen-Gen 2
p-Wert	lat. Probabilitas, Signifikanzwert
RAET1E	Retinsäure-Transkript 1E
RFS	engl. recurrence-free survival, rezidivfreies Überleben
ROS	engl. reactive oxygen species
R-Smad	Rezeptor-aktivierte-Smad
SEM	engl. standard error of the mean, Standardfehler
Smad	engl. Suppressor of Mothers Against Decapentaplegic
TAM	Tumor-assoziierte Makrophagen
TCA-Zyklus	Tricarbonsäurezyklus
TCGA	engl. The Cancer Genome Atlas
Tcm CD4	engl. Central memory CD4 T Cell
Tem CD4	engl. Effektor memory CD4 T cell
TEX	engl. Tumor-derived exosomes
Tgd	engl. Gamma delta T cell
TGFBRI	TGF-β Rezeptor Typ I
TGFβ	engl. Transforming Growth Factor, Transformierender Wachstumsfaktor
Th2	engl. Type 2 T helper cell
TIL	Tumorerinfiltrierende Lymphozyten
TISIDB	engl. Tumor-immune system interactions and drug bank database
TMA	engl. Tissue Microarray
TMU	Tumormikroumgebung
TNFRSF	Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor-Superfamilie
TNF-SF	Tumor-Nekrose-Faktor-Superfamilie
TNM	engl. tumor, node, metastasis
Treg	Regulatorische T-Zellen
T-Smad	Total-Smad
TβR-I und II	TGF-β-Rezeptor Typ I und II
UALCAN	CANcer Data Analysis Portal der University of Alabama
UICC	engl. Union for International Cancer Control
UV-Strahlung	Ultraviolette-Strahlung
VEGF	vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor

6.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: TNM-Klassifikation für Tumore der Mundhöhle modifiziert, aus der S3-Leitlinie für die Diagnostik und Therapie des Mundhöhlenkarzinoms [10]	8
Tabelle 2: Tumorstadien nach UICC-Kriterien modifiziert, aus der S3-Leitlinie für die Diagnostik und Therapie des Mundhöhlenkarzinoms [10]	9
Tabelle 3: Klinisch-pathologische Merkmale, der in dieser Arbeit untersuchten HNSCC-Patienten	46

6.3 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: TGF β - und BMP-Signalweg	14
Abbildung 2: Tumorfördernde Wirkungen von TGF β in der TMU	18
Abbildung 3: Vergleich der SMAD-Expression im Tumorgewebe und im gesunden Gewebe	29
Abbildung 4: Gesamtüberleben und tumorfreies Überleben bei niedriger und hoher R-Smad-Expression	31
Abbildung 5: Gesamtüberleben und tumorfreies Überleben bei niedriger und hoher SMAD4-Expression	32
Abbildung 6: Gesamtüberleben und tumorfreies Überleben bei niedriger und hoher I-Smad -Expression	33
Abbildung 7: SMAD-Expression in Patienten mit verschiedenen Lymphknotenstatus	34
Abbildung 8: SMAD-Expression in verschiedenen Stages	35
Abbildung 9: Korrelation der Expression der SMAD-Gene mit der Expression von immunstimulatorischen Faktoren	37
Abbildung 10: Korrelation der Expression der SMAD-Gene mit der Expression von immuninhibitorischen Faktoren	38
Abbildung 11: Korrelation der Expression der SMAD-Gene mit der Expression von ausgewählten Chemokinen	39
Abbildung 12: Korrelation der Expression der SMAD-Gene mit der Expression von ausgewählten Leukozyten	41
Abbildung 13: Korrelation der Smads mit tumorfördernden Krebssignaturen	43
Abbildung 14: Repräsentative immunhistochemische Färbungen des TMAs	44

Abbildung 15: Vergleich der P-Smad3- und T-Smad3-Expression im gesunden Gewebe und im Tumorgewebe.....	47
Abbildung 16: Vergleich der Expression von P-Smad3 und T-Smad3 in Tumorproben von männlichen und weiblichen Patienten	48
Abbildung 17: Vergleich der Expression von P-Smad3 und T-Smad3 in Bezug auf das Alter der Patienten	49
Abbildung 18: Vergleich der Expression von P-Smad3 und T-Smad3 in Bezug auf die Lokalisation des Primärtumors.....	50
Abbildung 19: Vergleich der Expression von P-Smad3 und T-Smad3 in Bezug auf die Tumorgröße	50
Abbildung 20: Vergleich der Expression von P-Smad3 und T-Smad3 in Bezug auf den Lymphknotenstatus	51
Abbildung 21: Vergleich der Expression von P-Smad3 und T-Smad3 in Tumorproben mit unterschiedlichem Grade.....	52
Abbildung 22: Vergleich der Expression von P-Smad3 und T-Smad3 in Tumorproben mit unterschiedlicher Stage	53

6.4 Liste der Markergene tumorfördernder Krebssignaturen, modifiziert nach Menyhart *et al.* [88]

Kennzeichenmerkmal	Marker-Gene
Aufrechterhaltung der proliferativen Signalübertragung und der Verlust von Wachstumssuppressoren	
Onkogene	<i>BAX, BCL2L1, CASP8, CDK4, ELK1, ETS1, HGF, JAK2, JUNB, JUND, KIT, KITLG, MCL1, MET, MOS, MYB, NFKBIA, NRAS, PIK3CA, PML, PRKCA, RAF1, RARA, REL, ROS1, RUNX1, SRC, STAT3, ZHX2</i>
Tumorsuppressorgene	<i>ATM, BRCA1, BRCA2, CDH1, CDKN2B, CDKN3, E2F1, FHIT, FOXD3, HIC1, IGF2R, MEN1, MGMT, MLH1, NF1, NF2, RASSF1, RUNX3, S100A4, SERPINB5, SMAD4, STK11, TP53, TP73, TSC1, VHL, WT1, WWOX, XRCC1</i>
Transkriptionsfaktoren	<i>ABL1, BRCA1, BRCA2, CDKN2A, CTNNB1, E2F1, ELK1, ESR1, ETS1, FOS, FOXD3, HIC1, JUN, JUNB, JUND, MDM2, MEN1, MYB, MYC, MYCN, NF1, NFKB1, PML, RARA, RB1, REL, RUNX1, RUNX3, SMAD4, STAT3, TGFB1, TNF, TP53, TP73, TSC1, VHL, WT1, ZHX2</i>
Zellzyklusgene	<i>ATM, BRCA1, BRCA2, CCND1, CDK4, CDKN1A, CDKN2A, CDKN2B, CDKN3, E2F1, HGF, MEN1, STK11</i>
Gene mit verschiedenen Funktionen	<i>BCR, EGF, ERBB2, ESR1, FOS, HRAS, JUN, KRAS, MDM2, MYC, MYCN, NFKB1, NRAS, PIK3C2A, RB1, RET, SH3PXD2A, TGFB1, TNF, TP53</i>
Widerstand gegen den Zelltod	
Durch die Bcl2-Familie regulierten Gene	<i>BCL2, BCL2L1, BCL2L2, BCL2L10-15, MCL1, BAX, BCL2A1, BAK1, BAD, BOK, BBC3, BIK, BNIP3L, HRK, BBC3, BID, BNIP3</i>
Gene des TNF-Rezeptorwegs	<i>TNFRSF1A, TNFRSF1B, TNFRSF10A, TNFRSF10B, TNFRSF10C, TNFRSF10, TNFRSF11, TNFRSF21, NGFR, TRAF1, TRADD</i>
TNF-Superfamilie	<i>TNF, TNFSF4, TNFSF8-15, LTA, LTB</i>
Gene des Fas-Signalwegs (CD95)	<i>FAS, FASLG</i>

Kennzeichenmerkmal	Marker-Gene
Kaspase-Familie	<i>CASP1 (ICE), CASP10 (MCH4), CASP14, CASP2, CASP3, CASP4, CASP5, CASP6, CASP7, CASP8, CASP9, CFLAR (CASPER), CRADD, PYCARD (TMS1/ASC)</i>
Gene des NF-kappa-B-Signalwegs	<i>NFKB1, NFKB2, NFKB3, NFKBIB, NFKBIA, NFKBIE, NFKBIKB, RELB, NFKBIZ, REL, IKBKE</i>
IAP-Familie	<i>DIABLO</i>
CARD-Familie	<i>APAF1, BLC10, RIPK2, BIRC1-8, CRADD, CARD4-19, NALP1, PYCARD</i>
Kinasen	<i>TBK1, DAPK1, CHUK</i>
Andere	<i>NOXA, SOCS3, DEDD, DEDD2, PEA15, DAXX, FADD</i>
TP53-Aktivatoren	<i>ATM, ATR, BBC3, BRCA1, CDKN1A (p21CIP1/WAF1), CDKN2A (p16INK4), CHEK1, CHEK2 (RAD53), FOXO3, GML, MDM2, MSH2, SIRT1, TP63, TP73</i>
TP53-Regulatoren	<i>CDKN2A (p16INK4), DNMT1, HDAC1, KAT2B, MDM2, MDM4, SIRT1, TADA3, TP53AIP1, TP53BP2, TP63 (TP73L), TP73</i>
Bestandteile des Signalwegs für Apoptose	<i>APAF1, BCL2, BCL2A1, BID, BIRC5, CASP2, CASP9, CRADD, FADD, FASLG (TNFSF6), IGF1R, MCL1, NF1, NFKB1, PIDD (LRDD), RELA, TNFRSF10D, TRAF2, WT1</i>
Bestandteile des Zellzykluswegs	<i>CCNB1, CCNE1, CCNG1, CCNH, CDK1 (CDC2), CDK4, PRC1, TSC1</i>
Bestandteile des DNA-Reparaturwegs	<i>BRCA2, MLH1, XRCC5</i>
Transkriptionsfaktoren	<i>BRCA2, EGR1, JUN, MYOD1, NFKB1, RELA, STAT1</i>

Ermöglichung replikativer Unsterblichkeit

Gene für den Erhalt der Telomere	<i>ACD, BLM, DCLRE1C, DKC1, ERCC1, ERCC4, HSPA1L, MRE11A, MYC, NBN (NBS1), PARP1 (ADPRT1), PIF1, POT1, PRKDC, PTGES3, RAD50, RFC1, RTEL1, SMG6, TEP1, TERF1, TERF2, TERF2IP, TERT, TINF2, TNKS (TIN1), TNKS2, XRCC5, XRCC6 (G22P1)</i>
Gene für die Regulierung der Telomerlänge	<i>RTEL1, TEP1, TERF1, TERF2IP, TNKS (TIN1)</i>

Kennzeichenmerkmal	Marker-Gene
Telomerase-Komplex	<i>DKC1, GAR1, NHP2, NOP10, TERT, WRAP53, hTR, NOLA1-3, ACD, POT1, RAP1A, TERF1, TERF2, TINF2, SLX4, ERCC1, ERCC4, EME1, MSH2, MSH3, MUS81, PLK1, TERF2, TERF2IP</i>
Telomerase-Regulation	<i>BL1, AKT1, ATP5C1, BCL2, EGF, IGF1, KRAS, MEN1, MYC, PAX8, PINX1, PPARG, PPP2R1A, PPP2R1B, PRKCA, PRKCB, RB1, SART1, SMAD3, SP1, SSB, TGFB1, TP53, MAD1L1, MEN1, SIP1,</i>
Gene des Seneszenzwegs	<i>ATM, BMI1, CCND1, CCNE1, CDK2, CDK4, CDK6, CDKN1A, CDKN2A (p16INK4), CDKN2D, CHEK1, CHEK2, E2F1, E2F3, ETS1, ETS2, MDM2, RB1, RBL2, TP53, TWIST1</i>
Seneszenz-Sekretom:	
Lösliche Faktoren	<i>IL-6, IL-7, IL-1, IL-13, IL-15</i>
Chemokine	<i>IL-8, GRO, MCP-2, MCP-4, MIP-1, MIP-3, HCC-4, EOTAXIN, TECK, ENA-78, I-309, I-TAC,</i>
Entzündungsfaktoren	<i>GM-CSF, G-CSF, IFN-γ, BLC, MIF</i>
Wachstumsfaktoren	<i>Amphiregulin, Eporegulin, Heregulin, EGF, Bfgf, HGF, KGF, VEGF, Angiogenin, SCF, SDF-1, PLGF, NGF, IGFBP-2-7</i>
Proteasen und Regulatoren	<i>MMP-1,-3,-10,-12,-13,-14, TIMP-1,-2, PAI-1,-2, tPA, uPA, Cathepsin B</i>
Lösliche oder abgesonderte Rezeptoren oder Liganden	<i>ICAM-1, -3, OPG, sTNFR1, TRAIL-R3, Fas, sTNFR2, uPAR, SGP130, EGF-R</i>
Nicht-proteinbasierte lösliche Faktoren	<i>PGE2, Stickoxid</i>
Unlösliche Faktoren (EZM)	<i>Fibronectin, Kollagene, Laminin</i>
Induktion der Angiogenese	
Wachstumsfaktoren und Rezeptoren	<i>ANG, ANGPT1, ANGPT2, ANPEP, TYMP, FGF1, FGF2 (bFGF), FIGF (VEGFD), FLT1, JAG1, KDR, NRP1, NRP2, PGF, VEGFA, VEGFB, VEGFC,</i>
Proteasen, Inhibitoren und andere Matrixproteine	<i>ANGPTL4, F3, PECAM1, PF4, PROK2, SERPINE1 (PAI-1), SERPINF1,</i>
Adhäsionsmoleküle	<i>BAI1, COL4A3, IL8, NRP1, NRP2</i>

Kennzeichenmerkmal	Marker-Gene
Zytokine und Chemokine	<i>BMP2, CCL15, CCL2, CSF3, CXCL11, CXCL12, CXCL13, CXCL14, CXCL3, CXCL5, CXCL6, CXCL9, IL10, IL6, IL8, PPBP, PTN, TNF</i>
Andere	<i>HIF1A, NOS3, SPHK1, AGGF1, AMOT, ANG, ANGPT1, BTG1, EDIL3, EREG, FST, RHOB, RUNX1</i>

Aktivierung von Invasion und Metastasierung

EMT-Transkriptionsfaktoren	<i>SNAI1, SNAI2, SNAI3, TWIST1, TWIST2, FOXOC2, TCF3, SMAD3, HIF1A, TGFB1, ZEB2, ZEB1</i>
Zellbeweglichkeit:	
Chemotaxis	<i>FGF2, ITGB2, MAPK1 (ERK2), MYH10, MYH9, PLAUR (uPAR), PLD1, PRKCA, RAC2, TGFB1, VEGFA, WASF2, WIPF1,</i>
Rezeptoren	<i>EGFR, IGF1R, ITGA4, ITGB1, ITGB2, ITGB3, MET, PLAUR (uPAR), RHO</i>
Wachstumsfaktoren	<i>CSF1 (MCSF), EGF, FGF2, HGF, IGF1, TGFB1, VEGFA</i>
Zell-Zell-Adhäsion	<i>DPP4, EGFR, EZR, ITGA4, ITGB1, ITGB2, MSN, MYH9, ROCK1, TGFB1,</i>
Zell-Matrix-Adhäsion	<i>ACTN1, ACTN3, CSF1 (MCSF), ILK, ITGB1, ITGB2, ITGB3, MMP14, PTEN, PTK2B, PXN, RASA1, RHOA,</i>
Fokale Adhäsion	<i>ACTN1, ACTN3, ARHGEF7, BCAR1, CAPN1, CAPN2, CAV1, ENAH, ILK, ITGB1, MYL9, PTK2, PTK2B, PXN, TLN1, VASP, VCL</i>
Proteolyse	<i>AKT1, CAPN1, CAPN2, DPP4, FAP, HGF, MMP14, MMP2 (Gelatinase A), MMP9 (Gelatinase B), MYH9, PLAUR (uPAR), TIMP2</i>
Filopodien	<i>BAIAP2, CDC42, DIAPH1, EGFR, ENAH, EZR, MSN, RDX, SVIL, VASP,</i>
Lamellopodien	<i>CTTN, DPP4, EGFR, ENAH, FAP, PIK3CA (p110a), PLD1, PTK2, PXN, RDX, SVIL, VASP, VCL, WASF1, WASF2, WASL</i>
Invasive Auswüchse	<i>ACTR2, ACTR3, ARF6, CDC42, CFL1, CTTN, DPP4, EGF, EZR, FAP, MMP14, MMP2 (Gelatinase A), MMP9 (Gelatinase B), MSN, MYH9, PLAUR (uPAR), RAC2, RASA1,</i>

Kennzeichenmerkmal			Marker-Gene
			<i>SH3PXD2A, SRC, SVIL, TGFB1, VEGFA, WASL, WIPF1</i>
GTPasen der Rho-Familie:			
Gene der Signalisierung	Rho-		<i>ACTR2, ACTR3, ARHGDIA, LIMK1, MSN, MYL9, MYLK, PLCG1, PLD1, PRKCA, PTEN, PTPN1, RHO, RHOA, RHOB, RHOC, RND3, ROCK1, VIM,</i>
Gene der Signalisierung	Rac-		<i>ACTR2, ACTR3, BAIAP2, CFL1, CRK, PAK1, PAK4, PLD1, PRKCA, RAC1, RAC2, STAT3, WASF1, WASF2, WASL,</i>
Gene der Signalisierung	Cdc42-		<i>ACTR2, ACTR3, CDC42, PFN1, WASF1, WASF2, WASL</i>
Invasion:			
Matrix-Metalloproteasen			<i>MMP10, MMP11, MMP13, MMP2, MMP3, MMP7, MMP9</i>
Transkriptionsfaktoren, Regulatoren, Sonstiges			<i>CHD4, ETV4, EWSR1, HTATIP2, MTA1, MYC, MYCL, NR4A3, RB1, RORB, SMAD2, SMAD4, TCF20, TP53, CST7, CTSK, CTSL, CD82 (KAI1), KISS1, METAP2, NME4,</i>
Genomische Instabilität			
Zellzyklus-Checkpoint-Gene			<i>ATM, ATR, ATRIP, BARD1, BRCA1, CDC25A, CHEK1, CHEK2 (RAD53), CSNK2A2, FANCD2, H2AFX, HUS1, MDC1, PARP1 (ADPRT1), RAD1, RAD17, RAD50, RAD9A, RBBP8, RNF168, RNF8, SMC1A, TOPBP1, TP53</i>
Gene der Exzisions-reparatur	Nukleotid-		<i>ATXN3, BRIP1, CCNH, CDK7, DDB1, DDB2, ERCC1, ERCC2, ERCC3, ERCC4, ERCC5, ERCC6, ERCC8, LIG1, MMS19, PNKP, POLL, RAD23A, RAD23B, RPA1, RPA3, SLK, XAB2, XPA, XPC</i>
Gene der Exzisionsreparatur	Basen-		<i>APEX1, APEX2, CCNO, LIG3, MPG, MUTYH, NEIL1, NEIL2, NEIL3, NTHL1, OGG1, PARP1, PARP2, PARP3, POLB, SMUG1, TDG, UNG, XRCC1</i>
Gene der Reparatur	Mismatch-		<i>MLH1, MLH3, MSH2, MSH3, MSH4, MSH5, MSH6, PMS1, PMS2, POLD3, TREX1</i>

Kennzeichenmerkmal	Marker-Gene
Gene der Reparatur von Doppelstrang-brüchen	<i>BRCA1, BRCA2, DMC1, FEN1, LIG4, MRE11A, PRKDC, RAD21, RAD50, RAD51, RAD51C, RAD51B, RAD51D, RAD52, RAD54L, XRCC2, XRCC3, XRCC4, XRCC5, XRCC6</i>
DNA-Replikations-Checkpoint-Gene	<i>BL1, CDC6, MCM2, MCM3, MCM4, MCM5, WEE1</i>
Checkpoint-Gene der mitotischen Phase	<i>AURKB, CCNB2, CCNF, CDC25C, CDC6, CDK1 (CDC2), CDC16, CDC20, MRE11A, RAD51, STMN1</i>
DNA-Reparatur	<i>AIMP2, APEX1, CHEK1, MSH2, NBN, NPM1, PCNA, TERT, TP53, BRCA1, BTG2, EGFR, GADD45A, PCNA, PTTG1, BRCA2, MLH1, XRCC5</i>
Histon-Acetylierung	<i>KAT5, NCOA1, NCOA3, KAT2B</i>
Histon-Deacetylierung	<i>HDAC1, HDAC2, HDAC3, HDAC4, HDAC5, HDAC6, HDAC7</i>
Chromatin-Modifikationsmoleküle	<i>ESR1, NCOA6, PPARGC1B, CBX3, NAP1L1</i>
Andere	<i>ATM, ATR, ATRIP, ATRX, BARD1, BRIP1, CHEK2 (RAD53), CIB1, CRY1, EXO1, FANCA, FANCD2, FANCG, GADD45A, GADD45G, MGMT, RAD1, RAD17, RAD18, RAD21, RAD51B, RAD9A, RBBP8, RDC1, REV1, RNF168, RNF8, SMC1A, SUMO1, TOP2A, TOPBP1, XRCC3, XRCC6BP1</i>

Deregulierung des Energiestoffwechsels

Gene der Glykolyse	<i>ALDOA, ALDOB, ALDOC, BPGM, ENO1, ENO2, ENO3, GALM, GCK, GPI, HK2, HK3, PFKL, PGAM2, PGK1, PGK2, PGM1, PGM2, PGM3, PKLR, TPI1</i>
Gene der Gluconeogenese	<i>FBP1, FBP2, G6PC, G6PC3, PC, PCK1, PCK2</i>
Regulationsgene	<i>PDK1, PDK2, PDK3, PDK4, PDP2, PDPR</i>
Gene des TCA-Zyklus	<i>ACLY, ACO1, ACO2, CS, DLAT, DLD, DLST, FH, IDH1, IDH2, IDH3A, IDH3B, IDH3G, MDH1, MDH1B, MDH2, OGDH, PC, PCK1, PCK2, PDHA1, PDHB, SDHA, SDHB, SDHC, SDHD, SUCLA2, SUCLG1, SUCLG2</i>
Gene des Pentosephosphatwegs	<i>G6PD, H6PD, PGLS, PRPS1, PRPS1L1, PRPS2, RBKS, RPE, RPIA, TALDO1, TKT</i>

Kennzeichenmerkmal	Marker-Gene
Gene des Glykogenstoffwechsels	<i>GBE1, GYS1, GYS2, UGP2, AGL, PGM1, PGM2, PGM3, PYGL, PYGM, GSK3A, GSK3B, PHKA1, PHKB, PHKG1, PHKG2</i>
Gene des Mitochondrialen Komplex I	<i>NDUFA1, NDUFA10, NDUFA11, NDUFA2, NDUFA3, NDUFA4, NDUFA5, NDUFA6, NDUFA8, NDUFAB1, NDUFB10, NDUFB2, NDUFB3, NDUFB4, NDUFB5, NDUFB6, NDUFB7, NDUFB8, NDUFB9, NDUFC1, NDUFC2, NDUFS1, N42FS, NDUFS, NDUFS5, NDUFS6, NDUFS7, NDUFS8, NDUFV1, NDUFV2, NDUFV3,</i>
Gene des Mitochondrialen Komplex II	<i>SDHA, SDHB, SDHC, SDHD</i>
Gene des Mitochondrialen Komplex III	<i>CYC1, UQCR11, UQCRC1, UQCRC2, UQCRFS1, UQCRH, UQCRQ</i>
Gene des Mitochondrialen Komplex IV	<i>COX4I1, COX5A, COX5B, COX6A1, COX6A2, COX6B1, COX6C, COX7A2, COX7A2L, COX7B, COX8A</i>
Gene des Mitochondrialen Komplex V	<i>ATP5A1, ATP5B, ATP5C1, ATP5F1, ATP5G1, ATP5G2, ATP5G3, ATP5H, ATP5I, ATP5J, ATP5J2, ATP5L, ATP5O, PPA1</i>
Vesikulationsbezogene Gene	
Aktivatorgene	<i>ARRDC3, ASB1, CYB561D1, DNAJB1, EDN1, GADD45B, HSPA1A, HSPA1B, LRP5L, MitoH1, MitoH2_12106, MitoH2_14573, MitoH2_4162, MitoH2_5726, RNU11, SLC25A25</i>

7 Literaturverzeichnis

1. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin.* 4. Mai 2021;71(3):209–49.
2. Johnson DE, Burtneß B, Leemans CR, Lui VWY, Bauman JE, Grandis JR. Head and neck squamous cell carcinoma. *Nat Rev Dis Primers.* 2020;6(1):92.
3. Koch-Institut R. Krebs in Deutschland für 2017/2018 [Internet]. 2017 [zitiert 23. Dezember 2023]. Verfügbar unter: <http://dx.doi.org/10.25646/8353>
4. Wong ICK, Ng YK, Lui VWY. Cancers of the lung, head and neck on the rise: perspectives on the genotoxicity of air Pollution. *Chin J Cancer.* 11. Juli 2014;33(10):476–80.
5. Guha N, Boffetta P, Wunsch Filho V, Eluf Neto J, Shangina O, Zaridze D, Curado MP, Koifman S, Matos E, Menezes A, Szeszenia-Dabrowska N, Fernandez L, Mates D, Daudt AW, Lissowska J, Dikshit R, Brennan P. Oral Health and Risk of Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck and Esophagus: Results of Two Multicentric Case-Control Studies. *Am J Epidemiol.* 30. August 2007;166(10):1159–73.
6. Freedman ND, Park Y, Subar AF, Hollenbeck AR, Leitzmann MF, Schatzkin A, Abnet CC. Fruit and vegetable intake and head and neck cancer risk in a large United States prospective cohort study. *Int J Cancer.* 18. Dezember 2007;122(10):2330–6.
7. Velleuer E, Dietrich R. Fanconi anemia: young patients at high risk for squamous cell carcinoma. *Mol Cell Pediatr.* 1. Dezember 2014;1(1):9.
8. Hennessey PT, Westra WH, Califano JA. Human Papillomavirus and Head and Neck Squamous Cell Carcinoma: Recent Evidence and Clinical Implications. *J Dent Res.* 30. April 2009;88(4):300–6.
9. Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive genomic characterization of head and neck squamous cell carcinomas. *Nature.* 29. Januar 2015;517(7536):576–82.
10. Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft DKA. S3-Leitlinie Diagnostik und Therapie des Mundhöhlenkarzinoms, Langversion 3.0 [Internet].

- 2021 [zitiert 24. Dezember 2023]. Verfügbar unter: <https://www.leitlinienprogrammonkologie.de/leitlinien/mundhoehlenkarzinom/>
11. Nishimaki T, Kanda T, Nakagawa S, Kosugi S ichi, Tanabe T, Hatakeyama K. Outcomes and prognostic factors after surgical resection of hypopharyngeal and cervical esophageal carcinomas. *Int Surg.* 2002;87(1):38–44.
 12. O'Brien CJ, Lauer CS, Fredricks S, Clifford AR, McNeil EB, Bagia JS, Koulmandas C. Tumor thickness influences prognosis of T1 and T2 oral cavity cancer—but what thickness? *Head Neck.* 12. November 2003;25(11):937–45.
 13. Hutchison IL, Ridout F, Cheung SMY, Shah N, Hardee P, Surwald C, Thiruchelvam J, Cheng L, Mellor TK, Brennan PA, Baldwin AJ, Shaw RJ, Halfpenny W, Danford M, Whitley S, Smith G, Bailey MW, Woodward B, Patel M, McManners J, Chan CH, Burns A, Praveen P, Camilleri AC, Avery C, Putnam G, Jones K, Webster K, Smith WP, Edge C, McVicar I, Grew N, Hislop S, Kalavrezos N, Martin IC, Hackshaw A. Nationwide randomised trial evaluating elective neck dissection for early stage oral cancer (SEND study) with meta-analysis and concurrent real-world cohort. *Br J Cancer.* 12. November 2019;121(10):827–36.
 14. Burtneß B, Harrington KJ, Greil R, Soulières D, Tahara M, de Castro G, Psyrri A, Basté N, Neupane P, Bratland Å, Fuereder T, Hughes BGM, Mesía R, Ngamphaiboon N, Rordorf T, Wan Ishak WZ, Hong RL, González Mendoza R, Roy A, Zhang Y, Gumuscu B, Cheng JD, Jin F, Rischin D, Lerzo G, Tatangelo M, Varela M, Zarba JJ, Boyer M, Gan H, Gao B, Hughes B, Mallesara G, Rischin D, Taylor A, Burian M, Fuereder T, Greil R, Barrios CH, de Castro Junior DO, Castro G, Franke FA, Girotto G, Lima IPF, Nicolau UR, Pinto GDJ, Santos L, Victorino AP, Chua N, Couture F, Gregg R, Hansen A, Hilton J, McCarthy J, Soulieres D, Ascuí R, Gonzalez P, Villanueva L, Torregroza M, Zambrano A, Holeckova P, Kral Z, Melichar B, Prausova J, Vosmik M, Andersen M, Gyldenkerne N, Jurgens H, Putnik K, Reinikainen P, Gruenwald V, Laban S, Aravantinos G, Boukovinas I, Georgoulas V, Psyrri A, Kwong D, Al-Farhat Y, Csoszi T, Erfan J, Horvai G, Landherr L, Remenar E, Ruzsa A, Szota J, Billan S, Gluck I, Gutfeld O, Popovtzer A, Benasso M, Bui S, Ferrari V, Licitra L, Nole F, Fujii T, Fujimoto Y, Hanai N, Hara H, Matsumoto K, Mitsugi K, Monden N, Nakayama M, Okami K, Oridate N, Shiga K, Shimizu Y, Sugasawa M, Tahara M, Takahashi M, Takahashi S, Tanaka K, Ueda T, Yamaguchi H, Yamazaki T,

Yasumatsu R, Yokota T, Yoshizaki T, Kudaba I, Stara Z, Wan Ishak WZ, Cheah SK, Aguilar Ponce J, Gonzalez Mendoza R, Hernandez Hernandez C, Medina Soto F, Buter J, Hoeben A, Oosting S, Suijkerbuijk K, Bratland A, Brydoey M, Alvarez R, Mas L, Caguioa P, Querol J, Regala EE, Tamayo MB, Villegas EM, Kaweck A, Karpenko A, Klochikhin A, Smolin A, Zarubenkov O, Goh BC, Cohen G, du Toit J, Jordaan C, Landers G, Ruff P, Szpak W, Tabane N, Brana I, Iglesias Docampo L, Lavernia J, Mesia R, Abel E, Muratidu V, Nielsen N, Cristina V, Rordorf T, Rothschild S, Hong RL, Wang HM, Yang MH, Yeh SP, Yen CJ, Ngamphaiboon N, Soparattanapaisarn N, Sriuranpong V, Aksoy S, Cicin I, Ekenel M, Harputluoglu H, Ozyilkan O, Harrington K, Agarwala S, Ali H, Alter R, Anderson D, Bruce J, Burtneess B, Campbell N, Conde M, Deeken J, Edenfield W, Feldman L, Gaughan E, Goueli B, Halmos B, Hegde U, Hunis B, Jotte R, Karnad A, Khan S, Laudi N, Laux D, Martincic D, McCune S, McGaughey D, Misiukiewicz K, Mulford D, Nadler E, Neupane P, Nunnink J, Ohr J, O'Malley M, Patson B, Paul D, Popa E, Powell S, Redman R, Rella V, Rocha Lima C, Sivapiragasam A, Su Y, Sukari A, Wong S, Yilmaz E, Yorio J. Pembrolizumab alone or with chemotherapy versus cetuximab with chemotherapy for recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck (KEYNOTE-048): a randomised, open-label, phase 3 study. *The Lancet*. November 2019;394(10212):1915–28.

15. Whiteside TL. Head and Neck Carcinoma Immunotherapy: Facts and Hopes. *Clinical Cancer Research*. 1. Januar 2018;24(1):6–13.
16. Grandis JR, Melhem MF, Gooding WE, Day R, Holst VA, Wagener MM, Drenning SD, Twardy DJ. Levels of TGF- α and EGFR Protein in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma and Patient Survival. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*. 3. Juni 1998;90(11):824–32.
17. Esfahani K, Roudaia L, Buhlaiga N, Del Rincon S V, Papneja N, Miller WH. A review of cancer immunotherapy: from the past, to the present, to the future. *Curr Oncol*. April 2020;27(Suppl 2):S87–97.
18. Mei Z, Huang J, Qiao B, Lam AKY. Immune checkpoint pathways in immunotherapy for head and neck squamous cell carcinoma. *Int J Oral Sci*. 28. Mai 2020;12(1):16.

19. Dogan V, Rieckmann T, Münscher A, Busch CJ. Current studies of immunotherapy in head and neck cancer. *Clinical Otolaryngology*. Februar 2018;43(1):13–21.
20. Kao H, Lou P. Immune checkpoint inhibitors for head and neck squamous cell carcinoma: Current landscape and future directions. *Head Neck*. Oktober 2019;41(S1):4–18.
21. Cohen EEW, Bell RB, Bifulco CB, Burtneß B, Gillison ML, Harrington KJ, Le QT, Lee NY, Leidner R, Lewis RL, Licitra L, Mehanna H, Mell LK, Raben A, Sikora AG, Uppaluri R, Whitworth F, Zandberg DP, Ferris RL. The Society for Immunotherapy of Cancer consensus statement on immunotherapy for the treatment of squamous cell carcinoma of the head and neck (HNSCC). *J Immunother Cancer*. 15. Dezember 2019;7(1):184.
22. Xiao Y, Yu D. Tumor microenvironment as a therapeutic target in cancer. *Pharmacol Ther*. Mai 2021;221:107753.
23. Hinshaw DC, Shevde LA. The Tumor Microenvironment Innately Modulates Cancer Progression. *Cancer Res*. 15. September 2019;79(18):4557–66.
24. Pansy K, Uhl B, Krstic J, Szmyra M, Fechter K, Santiso A, Thüminger L, Greinix H, Kargl J, Prochazka K, Feichtinger J, Deutsch AJ. Immune Regulatory Processes of the Tumor Microenvironment under Malignant Conditions. *Int J Mol Sci*. 10. Dezember 2021;22(24):13311.
25. Anderson NM, Simon MC. The tumor microenvironment. *Curr Biol*. 17. August 2020;30(16):R921–5.
26. Anderson NM, Simon MC. The Tumor Microenvironment. *Current Biology*. August 2020;30(16):R921–5.
27. Jumaniyazova E, Lokhonina A, Dzhaililova D, Kosyreva A, Fatkhudinov T. Immune Cells in Head-and-Neck Tumor Microenvironments. *J Pers Med*. 16. September 2022;12(9):1521.
28. Chen SMY, Krinsky AL, Woolaver RA, Wang X, Chen Z, Wang JH. Tumor immune microenvironment in head and neck cancers. *Mol Carcinog*. Juli 2020;59(7):766–74.
29. Costa NL, Valadares MC, Souza PPC, Mendonça EF, Oliveira JC, Silva TA, Batista AC. Tumor-associated macrophages and the profile of inflammatory cytokines in oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol*. März 2013;49(3):216–23.

30. Wu MY, Hill CS. TGF- β Superfamily Signaling in Embryonic Development and Homeostasis. *Dev Cell*. März 2009;16(3):329–43.
31. Böttner M, Krieglstein K, Unsicker K. The Transforming Growth Factor- β s. *J Neurochem*. 29. Dezember 2000;75(6):2227–40.
32. Böttner M, Krieglstein K, Unsicker K. The Transforming Growth Factor- β s. *J Neurochem*. 29. Juli 2008;75(6):2227–40.
33. van den Bulk J, de Miranda NFCC, ten Dijke P. Therapeutic targeting of TGF- β in cancer: hacking a master switch of immune suppression. *Clin Sci*. 15. Januar 2021;135(1):35–52.
34. Hinck AP, Mueller TD, Springer TA. Structural Biology and Evolution of the TGF- β Family. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. Dezember 2016;8(12):a022103.
35. Hinck AP. Structure-guided engineering of TGF- β s for the development of novel inhibitors and probing mechanism. Bd. 26, *Bioorganic and Medicinal Chemistry*. Elsevier Ltd; 2018. S. 5239–46.
36. Morikawa M, Derynck R, Miyazono K. TGF- β and the TGF- β Family: Context-Dependent Roles in Cell and Tissue Physiology. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2. Mai 2016;8(5):a021873.
37. Shi M, Zhu J, Wang R, Chen X, Mi L, Walz T, Springer TA. Latent TGF- β structure and activation. *Nature*. 15. Juni 2011;474(7351):343–9.
38. Robertson IB, Rifkin DB. Regulation of the Bioavailability of TGF- β and TGF- β -Related Proteins. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 1. Juni 2016;8(6):a021907.
39. Wang R, Wan Q, Kozhaya L, Fujii H, Unutmaz D. Identification of a Regulatory T Cell Specific Cell Surface Molecule that Mediates Suppressive Signals and Induces Foxp3 Expression. *PLoS One*. 16. Juli 2008;3(7):e2705.
40. Tran DQ, Andersson J, Wang R, Ramsey H, Unutmaz D, Shevach EM. GARP (LRRC32) is essential for the surface expression of latent TGF- β on platelets and activated FOXP3⁺ regulatory T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 11. August 2009;106(32):13445–50.
41. Batlle E, Massagué J. Transforming Growth Factor- β Signaling in Immunity and Cancer. *Immunity*. April 2019;50(4):924–40.
42. Heldin CH, Moustakas A. Signaling Receptors for TGF- β Family Members. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 1. August 2016;8(8):a022053.
43. Derynck R, Budi EH. Specificity, versatility, and control of TGF- β family signaling. *Sci Signal*. 26. Februar 2019;12(570):eaav5183.

44. Dituri F, Cossu C, Mancarella S, Giannelli G. The Interactivity between TGF β and BMP Signaling in Organogenesis, Fibrosis, and Cancer. *Cells*. 23. September 2019;8(10):1130.
45. Derynck R, Zhang YE. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF- β family signalling. *Nature*. 9. Oktober 2003;425(6958):577–84.
46. Massagué J, Seoane J, Wotton D. Smad transcription factors. *Genes Dev*. 1. Dezember 2005;19(23):2783–810.
47. Katakawa Y, Funaba M, Murakami M. Smad8/9 Is Regulated Through the BMP Pathway. *J Cell Biochem*. August 2016;117(8):1788–96.
48. Pang X, Tang Y, Liang X. Transforming growth factor- β signaling in head and neck squamous cell carcinoma: Insights into cellular responses (Review). *Oncol Lett*. 17. August 2018;16(4):4799–806.
49. Kim BG, Malek E, Choi SH, Ignatz-Hoover JJ, Driscoll JJ. Novel therapies emerging in oncology to target the TGF- β pathway. *J Hematol Oncol*. 6. Dezember 2021;14(1):55.
50. Bian Y, Hall B, Sun ZJ, Molinolo A, Chen W, Gutkind JS, Waes C v, Kulkarni AB. Loss of TGF- β signaling and PTEN promotes head and neck squamous cell carcinoma through cellular senescence evasion and cancer-related inflammation. *Oncogene*. 12. Juli 2012;31(28):3322–32.
51. Yang L, Pang Y, Moses HL. TGF- β and immune cells: an important regulatory axis in the tumor microenvironment and progression. *Trends Immunol*. Juni 2010;31(6):220–7.
52. Ludwig N, Wieteska Ł, Hinck CS, Yerneni SS, Azambuja JH, Bauer RJ, Reichert TE, Hinck AP, Whiteside TL. Novel TGF β inhibitors ameliorate oral squamous cell carcinoma progression and improve the antitumor immune response of anti-PD-L1 immunotherapy. *Mol Cancer Ther*. 1. Juni 2021;20(6):1102–11.
53. Nair S, Nayak R, Bhat K, Kotrashetti VS, Babji D. Immunohistochemical Expression of CD105 and TGF- β 1 in Oral Squamous Cell Carcinoma and Adjacent Apparently Normal Oral Mucosa and its Correlation With Clinicopathologic Features. *Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology*. Januar 2016;24(1):35–41.
54. Metelli A, Wu BX, Fugle CW, Rachidi S, Sun S, Zhang Y, Wu J, Tomlinson S, Howe PH, Yang Y, Garrett-Mayer E, Liu B, Li Z. Surface Expression of TGF β

- Docking Receptor GARP Promotes Oncogenesis and Immune Tolerance in Breast Cancer. *Cancer Res.* 15. Dezember 2016;76(24):7106–17.
55. Metelli A, Wu BX, Fugle CW, Rachidi S, Sun S, Zhang Y, Wu J, Tomlinson S, Howe PH, Yang Y, Garrett-Mayer E, Liu B, Li Z. Surface Expression of TGF β Docking Receptor GARP Promotes Oncogenesis and Immune Tolerance in Breast Cancer. *Cancer Res.* 15. Dezember 2016;76(24):7106–17.
 56. Bauvois B, Rouillard D, Sanceau J, Wietzerbin J. IFN-gamma and transforming growth factor-beta 1 differently regulate fibronectin and laminin receptors of human differentiating monocytic cells. *J Immunol.* 15. Juni 1992;148(12):3912–9.
 57. Webber J, Steadman R, Mason MD, Tabi Z, Clayton A. Cancer Exosomes Trigger Fibroblast to Myofibroblast Differentiation. *Cancer Res.* 1. Dezember 2010;70(23):9621–30.
 58. Haque S, Morris JC. Transforming growth factor- β : A therapeutic target for cancer. *Hum Vaccin Immunother.* 3. August 2017;13(8):1741–50.
 59. Tauriello DVF, Palomo-Ponce S, Stork D, Berenguer-Llargo A, Badia-Ramentol J, Iglesias M, Sevillano M, Ibiza S, Cañellas A, Hernando-Momblona X, Byrom D, Matarin JA, Calon A, Rivas EI, Nebreda AR, Riera A, Attolini CSO, Batlle E. TGF β drives immune evasion in genetically reconstituted colon cancer metastasis. *Nature.* 14. Februar 2018;554(7693):538–43.
 60. Seoane J, Gomis RR. TGF- β Family Signaling in Tumor Suppression and Cancer Progression. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* Dezember 2017;9(12):a022277.
 61. Brunen D, Willems S, Kellner U, Midgley R, Simon I, Bernards R. TGF- β : An emerging player in drug resistance. *Cell Cycle.* 15. September 2013;12(18):2960–8.
 62. Brown JA, Yonekubo Y, Hanson N, Sastre-Perona A, Basin A, Rytlewski JA, Dolgalev I, Meehan S, Tsirigos A, Beronja S, Schober M. TGF- β -Induced Quiescence Mediates Chemoresistance of Tumor-Propagating Cells in Squamous Cell Carcinoma. *Cell Stem Cell.* 2. November 2017;21(5):650–664.e8.
 63. Ebbing EA, Steins A, Fessler E, Stathi P, Lesterhuis WJ, Krishnadath KK, Vermeulen L, Medema JP, Bijlsma MF, van Laarhoven HWM. Esophageal Adenocarcinoma Cells and Xenograft Tumors Exposed to Erb-b2 Receptor

- Tyrosine Kinase 2 and 3 Inhibitors Activate Transforming Growth Factor Beta Signaling, Which Induces Epithelial to Mesenchymal Transition. *Gastroenterology*. Juli 2017;153(1):63-76.e14.
64. Neuzillet C, Tijeras-Raballand A, Cohen R, Cros J, Faivre S, Raymond E, de Gramont A. Targeting the TGF β pathway for cancer therapy. *Pharmacol Ther*. März 2015;147:22–31.
 65. Ludwig N, Yerneni SS, Azambuja JH, Pietrowska M, Widłak P, Hinck CS, Głuszko A, Szczepański MJ, Kärmer T, Kallinger I, Schulz D, Bauer RJ, Spanier G, Spoerl S, Meier JK, Ettl T, Razzo BM, Reichert TE, Hinck AP, Whiteside TL. TGF β + small extracellular vesicles from head and neck squamous cell carcinoma cells reprogram macrophages towards a pro-angiogenic phenotype. *J Extracell Vesicles*. 20. Dezember 2022;11(12):12294.
 66. Zhu H, Gu X, Xia L, Zhou Y, Bouamar H, Yang J, Ding X, Zwieb C, Zhang J, Hinck AP, Sun LZ, Zhu X. A novel TGF β trap blocks chemotherapeutics-induced TGF β 1 signaling and enhances their anticancer activity in gynecologic cancers. *Clinical Cancer Research*. 15. Juni 2018;24(12):2780–93.
 67. Qin T, Barron L, Xia L, Huang H, Villarreal MM, Zwaagstra J, Collins C, Yang J, Zwieb C, Kodali R, Hinck CS, Kim SK, Reddick RL, Shu C, O'Connor-McCourt MD, Hinck AP, Sun LZ. A novel highly potent trivalent TGF- β receptor trap inhibits early-stage tumorigenesis and tumor cell invasion in murine Pten-deficient prostate glands. *Oncotarget*. 27. Dezember 2016;7(52):86087–102.
 68. Liu Q, Ma L, Jones T, Palomero L, Pujana MA, Martinez-Ruiz H, Ha PK, Murnane J, Cuartas I, Seoane J, Baumann M, Linge A, Barcellos-Hoff MH. Subjugation of TGF β Signaling by Human Papilloma Virus in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Shifts DNA Repair from Homologous Recombination to Alternative End Joining. *Clinical Cancer Research*. 1. Dezember 2018;24(23):6001–14.
 69. Mortezaee K, Majidpoor J. Transforming growth factor- β signalling in tumour resistance to the anti-PD-(L)1 therapy: Updated. *J Cell Mol Med*. 10. Februar 2023;27(3):311–21.
 70. Teixeira AF, ten Dijke P, Zhu HJ. On-Target Anti-TGF- β Therapies Are Not Succeeding in Clinical Cancer Treatments: What Are Remaining Challenges? *Front Cell Dev Biol*. 8. Juli 2020;8:605.
 71. Zhang M, Kleber S, Röhrich M, Timke C, Han N, Tuettenberg J, Martin-Villalba A, Debus J, Peschke P, Wirkner U, Lahn M, Huber PE. Blockade of TGF- β

- Signaling by the TGF β R-I Kinase Inhibitor LY2109761 Enhances Radiation Response and Prolongs Survival in Glioblastoma. *Cancer Res.* 1. Dezember 2011;71(23):7155–67.
72. Redman JM, Friedman J, Robbins Y, Sievers C, Yang X, Lassoued W, Sinkoe A, Papanicolau-Sengos A, Lee CC, Marte JL, Turkbey E, Mydlarz W, Joshi A, London NR, Pierce M, Taylor R, Hong S, Nguyen A, Soon-Shiong P, Schlom J, Gulley JL, Allen CT. Enhanced neoepitope-specific immunity following neoadjuvant PD-L1 and TGF- β blockade in HPV-unrelated head and neck cancer. *Journal of Clinical Investigation.* 15. September 2022;132(18):e161400.
 73. Matthews E, Yang T, Janulis L, Goodwin S, Kundu SD, Karpus WJ, Lee C. Down-regulation of TGF- β 1 production restores immunogenicity in prostate cancer cells. *Br J Cancer.* August 2000;83(4):519–25.
 74. Oh J, Barve M, Matthews CM, Koon EC, Heffernan TP, Fine B, Grosen E, Bergman MK, Fleming EL, DeMars LR, West L, Spitz DL, Goodman H, Hancock KC, Wallraven G, Kumar P, Bognar E, Manning L, Pappen BO, Adams N, Senzer N, Nemunaitis J. Phase II study of Vigil® DNA engineered immunotherapy as maintenance in advanced stage ovarian cancer. *Gynecol Oncol.* Dezember 2016;143(3):504–10.
 75. Moore KM, Thomas GJ, Duffy SW, Warwick J, Gabe R, Chou P, Ellis IO, Green AR, Haider S, Brouillette K, Saha A, Vallath S, Bowen R, Chelala C, Eccles D, Tapper WJ, Thompson AM, Quinlan P, Jordan L, Gillett C, Brentnall A, Violette S, Weinreb PH, Kendrew J, Barry ST, Hart IR, Jones JL, Marshall JF. Therapeutic Targeting of Integrin $\alpha\beta 6$ in Breast Cancer. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute.* August 2014;106(8):dju169.
 76. Cristina V, Herrera-Gómez RG, Szturz P, Espeli V, Siano M. Immunotherapies and Future Combination Strategies for Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Int J Mol Sci.* 30. Oktober 2019;20(21):5399.
 77. Havel JJ, Chowell D, Chan TA. The evolving landscape of biomarkers for checkpoint inhibitor immunotherapy. *Nat Rev Cancer.* 12. März 2019;19(3):133–50.
 78. Kim SK, Barron L, Hinck CS, Petrunak EM, Cano KE, Thangirala A, Iskra B, Brothers M, Vonberg M, Leal B, Richter B, Kodali R, Taylor AB, Du S, Barnes CO, Sulea T, Calero G, Hart PJ, Hart MJ, Demeler B, Hinck AP. An engineered transforming growth factor β (TGF- β) monomer that functions as a dominant

- negative to block TGF- β signaling. *Journal of Biological Chemistry*. April 2017;292(17):7173–88.
79. Bedi A, Chang X, Noonan K, Pham V, Bedi R, Fertig EJ, Considine M, Califano JA, Borrello I, Chung CH, Sidransky D, Ravi R. Inhibition of TGF- β enhances the in vivo antitumor efficacy of EGF receptor-targeted therapy. *Mol Cancer Ther*. November 2012;11(11):2429–39.
 80. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*. März 2011;144(5):646–74.
 81. Tang Z, Li C, Kang B, Gao G, Li C, Zhang Z. GEPIA: a web server for cancer and normal gene expression profiling and interactive analyses. *Nucleic Acids Res*. 3. Juli 2017;45(W1):W98–102.
 82. GEPIA [Internet]. 2023 [zitiert 24. Dezember 2023]. Verfügbar unter: <http://gepia2.cancer-pku.cn/#index>
 83. UALCAN [Internet]. 2023 [zitiert 24. Dezember 2023]. Verfügbar unter: <https://ualcan.path.uab.edu/analysis.html>
 84. Chandrashekar DS, Karthikeyan SK, Korla PK, Patel H, Shovon AR, Athar M, Netto GJ, Qin ZS, Kumar S, Manne U, Creighton CJ, Varambally S. UALCAN: An update to the integrated cancer data analysis platform. *Neoplasia*. März 2022;25:18–27.
 85. TISIDB [Internet]. 2023 [zitiert 24. Dezember 2023]. Verfügbar unter: <http://cis.hku.hk/TISIDB/index.php>
 86. TISIDB. *Bioinformatics*. 15. Oktober 2019;35(20):4200–2.
 87. Charoentong P, Finotello F, Angelova M, Mayer C, Efremova M, Rieder D, Hackl H, Trajanoski Z. Pan-cancer Immunogenomic Analyses Reveal Genotype-Immunophenotype Relationships and Predictors of Response to Checkpoint Blockade. *Cell Rep*. Januar 2017;18(1):248–62.
 88. Menyhárt O, Harami-Papp H, Sukumar S, Schäfer R, Magnani L, de Barrios O, Györfy B. Guidelines for the selection of functional assays to evaluate the hallmarks of cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*. Dezember 2016;1866(2):300–19.
 89. Ludwig N, Yerneni SS, Harasymczuk M, Szczepański MJ, Głuszko A, Kukwa W, Jordan T, Spanier G, Taxis J, Spoerl S, Meier JK, Hinck CS, Campbell PG, Reichert TE, Hinck AP, Whiteside TL. TGF β carrying exosomes in plasma:

- potential biomarkers of cancer progression in patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Br J Cancer*. 18. Mai 2023;128(9):1733–41.
90. Razzo BM, Ludwig N, Hong CS, Sharma P, Fabian KP, Fecek RJ, Storkus WJ, Whiteside TL. Tumor-derived exosomes promote carcinogenesis of murine oral squamous cell carcinoma. *Carcinogenesis*. 10. Juli 2020;41(5):625–33.
 91. Liu Q, Chen G, Moore J, Guix I, Placantonakis D, Barcellos-Hoff MH. Exploiting Canonical TGF β Signaling in Cancer Treatment. *Mol Cancer Ther*. 1. Januar 2022;21(1):16–24.
 92. Wu J, Zhang M, Faruq O, Zacksenhaus E, Chen W, Liu A, Chang H. SMAD1 as a biomarker and potential therapeutic target in drug-resistant multiple myeloma. *Biomark Res*. 16. Dezember 2021;9(1):48.
 93. Zhou J, Wang M, Mao A, Zhao Y, Wang L, Xu Y, Jia H, Wang L. Long noncoding RNA MALAT1 sponging miR-26a-5p to modulate Smad1 contributes to colorectal cancer progression by regulating autophagy. *Carcinogenesis*. 12. November 2021;42(11):1370–9.
 94. Xu T, Yu C yun, Sun J jie, Liu Y, Wang X wei, Pi L ming, Tian Y quan, Zhang X. Bone Morphogenetic Protein-4-induced Epithelial-Mesenchymal Transition and Invasiveness Through Smad1-mediated Signal Pathway in Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck. *Arch Med Res*. Februar 2011;42(2):128–37.
 95. Nagy Á, Munkácsy G, Györffy B. Pancancer survival analysis of cancer hallmark genes. *Sci Rep*. 15. März 2021;11(1):6047.
 96. Mangone FR, Walder F, Maistro S, Pasini FS, Lehn CN, Carvalho MB, Brentani MM, Snitcovsky I, Federico MH. Smad2 and Smad6 as predictors of overall survival in oral squamous cell carcinoma patients. *Mol Cancer*. 2010;9(1):106.
 97. Bruna A, Darken RS, Rojo F, Ocaña A, Peñuelas S, Arias A, Paris R, Tortosa A, Mora J, Baselga J, Seoane J. High TGF β -Smad Activity Confers Poor Prognosis in Glioma Patients and Promotes Cell Proliferation Depending on the Methylation of the PDGF-B Gene. *Cancer Cell*. Februar 2007;11(2):147–60.
 98. Qian Z, Zhang Q, Hu Y, Zhang T, Li J, Liu Z, Zheng H, Gao Y, Jia W, Hu A, Li B, Hao J. Investigating the mechanism by which SMAD3 induces PAX6 transcription to promote the development of non-small cell lung cancer. *Respir Res*. 29. Dezember 2018;19(1):262.

99. Kim SH, Kim KH, Ahn S, Hyeon J, Park CK. Smad3 and Smad3 Phosphoisoforms Are Prognostic Markers of Gastric Carcinoma. *Dig Dis Sci*. 18. April 2013;58(4):989–97.
100. Yamazaki K, Masugi Y, Effendi K, Tsujikawa H, Hiraoka N, Kitago M, Shinoda M, Itano O, Tanabe M, Kitagawa Y, Sakamoto M. Upregulated SMAD3 promotes epithelial–mesenchymal transition and predicts poor prognosis in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Laboratory Investigation*. Juni 2014;94(6):683–91.
101. Balkwill F. Cancer and the chemokine network. *Nat Rev Cancer*. Juli 2004;4(7):540–50.
102. Huang Y, Liu H, Liu X, Li N, Bai H, Guo C, Xu T, Zhu L, Liu C, Xiao J. The Chemokines Initiating and Maintaining Immune Hot Phenotype Are Prognostic in ICB of HNSCC. *Front Genet*. 27. Mai 2022;13:13–820065.
103. Wei C, Ma Y, Wang F, Liao Y, Chen Y, Zhao B, Zhao Q, Wang D, Tang D. Igniting Hope for Tumor Immunotherapy: Promoting the “Hot and Cold” Tumor Transition. *Clin Med Insights Oncol*. 15. Januar 2022;16:117955492211207.
104. Reichert TE, Scheuer C, Day R, Wagner W, Whiteside TL. The number of intratumoral dendritic cells and zeta-chain expression in T cells as prognostic and survival biomarkers in patients with oral carcinoma. *Cancer*. 1. Juni 2001;91(11):2136–47.
105. Plesca I, Müller L, Böttcher JP, Medyouf H, Wehner R, Schmitz M. Tumor-associated human dendritic cell subsets: Phenotype, functional orientation, and clinical relevance. *Eur J Immunol*. 24. November 2022;52(11):1750–8.
106. Zhang SC, Hu ZQ, Long JH, Zhu GM, Wang Y, Jia Y, Zhou J, Ouyang Y, Zeng Z. Clinical Implications of Tumor-Infiltrating Immune Cells in Breast Cancer. *J Cancer*. 2019;10(24):6175–84.
107. Orłowski J. SMAD5 signaling: more than meets the nuclei. *Cell Res*. 15. September 2017;27(9):1075–6.
108. Ding N, Luo H, Zhang T, Peng T, Yao Y, He Y. Correlation between SMADs and Colorectal Cancer Expression, Prognosis, and Immune Infiltrates. *Int J Anal Chem*. 2023;2023:8414040.
109. Hernandez AL, Wang Y, Somerset HL, Keysar SB, Aisner DL, Marshall C, Bowles DW, Karam SD, Raben D, Jimeno A, Varella-Garcia M, Wang X. Inter- and intra-tumor heterogeneity of *SMAD4* loss in head and neck squamous cell carcinomas. *Mol Carcinog*. 16. Mai 2019;58(5):666–73.

110. Bornstein S, White R, Malkoski S, Oka M, Han G, Cleaver T, Reh D, Andersen P, Gross N, Olson S, Deng C, Lu SL, Wang XJ. Smad4 loss in mice causes spontaneous head and neck cancer with increased genomic instability and inflammation. *Journal of Clinical Investigation*. 19. Oktober 2009;119(11):3408–19.
111. Natsugoe S, Xiangming C, Matsumoto M, Okumura H, Nakashima S, Sakita H, Ishigami S, Baba M, Takao S, Aikou T. Smad4 and transforming growth factor beta1 expression in patients with squamous cell carcinoma of the esophagus. *Clin Cancer Res*. Juni 2002;8(6):1838–42.
112. Shi Y, Massagué J. Mechanisms of TGF- β Signaling from Cell Membrane to the Nucleus. *Cell*. Juni 2003;113(6):685–700.
113. de Boeck M, Cui C, Mulder AA, Jost CR, Ikeno S, ten Dijke P. Smad6 determines BMP-regulated invasive behaviour of breast cancer cells in a zebrafish xenograft model. *Sci Rep*. 26. April 2016;6(1):24968.
114. Stolfi C, Marafini I, De Simone V, Pallone F, Monteleone G. The Dual Role of Smad7 in the Control of Cancer Growth and Metastasis. *Int J Mol Sci*. 5. Dezember 2013;14(12):23774–90.
115. Xiao Q, Chen J, Zhu J, Zeng S, Cai H, Zhu G. Association of several loci of SMAD7 with colorectal cancer: A meta-analysis based on case–control studies. *Medicine*. 6. Januar 2023;102(1):e32631.
116. Nakao A, Afrakhte M, Morn A, Nakayama T, Christian JL, Heuchel R, Itoh S, Kawabata M, Heldin NE, Heldin CH, Dijke P ten. Identification of Smad7, a TGF β -inducible antagonist of TGF- β signalling. *Nature* [Internet]. Oktober 1997;389(6651):631–5. Verfügbar unter: <https://www.nature.com/articles/39369>
117. Nikanjam M, Kato S, Kurzrock R. Liquid biopsy: current technology and clinical applications. *J Hematol Oncol*. 12. September 2022;15(1):131.
118. Nikanjam M, Kato S, Kurzrock R. Liquid biopsy: current technology and clinical applications. *J Hematol Oncol*. 12. September 2022;15(1):131.
119. Whiteside TL, Diergaarde B, Hong CS. Tumor-Derived Exosomes (TEX) and Their Role in Immuno-Oncology. *Int J Mol Sci*. 9. Juni 2021;22(12):6234.
120. Syed V. TGF- β Signaling in Cancer. *J Cell Biochem*. 11. Juni 2016;117(6):1279–87.

8 Danksagung

Mein Dank gilt Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert für die Möglichkeit, diese Dissertation in seiner Klinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie anzufertigen.

Ich möchte mich hiermit herzlich bei meinem Doktorvater PD Dr. Dr. Gerrit Spanier und meinem Betreuer Dr. Nils Ludwig für die Bereitstellung des Themas, die umfassende Betreuung und die ständige Erreichbarkeit bedanken.

Ich bedanke mich zudem bei allen Autoren der in British Journal of Cancer publizierten Studie, in welcher ich Teile meiner Daten publizieren konnte. Die exzellente Zusammenarbeit und die Möglichkeit der Teilnahme an einem international ausgerichteten Forschungsprojekt haben diese Arbeit sehr bereichert.

Meinem Schwiegervater danke ich außerdem für die liebevolle Betreuung meines Sohnes während dieser Zeit. Meinem Ehemann gilt besonderer Dank für seine Unterstützung und Ermutigung.

Ebenso möchte ich meinen Eltern für ihre Unterstützung und Ermöglichung meines Studiums danken.

10 Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit mit dem Titel „Klinische Relevanz des Smad-Signalwegs im Plattenepithelkarzinom des Kopf-Hals-Bereichs“ ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeit erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen. Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Flensburg, den _____

(Theresa Jordan)