

Institut für Pathologie
der Universitätsmedizin Rostock
Direktor: Prof. Dr. med. A. Erbersdobler

**CKLF-like MARVEL transmembrane domain containing
Protein 6 (CMTM6) als prognostischer Biomarker
im nicht-kutanen Plattenepithelkarzinom
des Kopf-Hals-Bereichs**

Inauguraldissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin
der Universitätsmedizin Rostock

vorgelegt von
Carsten Nikolas Schofeld
Rostock, August 2023

Amtierender Dekan: Prof. Dr. med. Steffen Emmert

1. Gutachter: PD Dr. med. habil. Annette Zimpfer, Universitätsmedizin Rostock, Abt. Pathologie
2. Gutachter: Prof. Dr. med. Dr. med. dent. Bernhard Frerich, Universitätsmedizin Rostock, Abt. MKG
3. Gutachter: PD Dr. med. Daniela E. Aust, Universitätsklinikum Dresden, Abt. Pathologie

Jahr der Veröffentlichung: 2023

Jahr der Verteidigung: 2024

**CKLF-like MARVEL transmembrane domain containing Protein 6 (CMTM6)
als prognostischer Biomarker im nicht-kutanen Plattenepithelkarzinom
des Kopf-Hals-Bereichs**

Thesen

Nicht-kutane Plattenepithelkarzinome im Kopf-Hals-Bereich (HNSCC) stellen eine heterogene Gruppe maligner Neoplasien mit Manifestation in Mundhöhle, Rachen, Speicheldrüsen, Larynx sowie auf den Lippen dar. Weltweit zählt das HNSCC mit einer Inzidenz von ca. 800.000 Fällen pro Jahr zu den acht häufigsten Krebserkrankungen.

Die Hauptrisikofaktoren in Deutschland für die Entstehung eines HNSCC sind einerseits chronischer Tabak- und Alkoholkonsum sowie andererseits die Infektion mit onkogenen Viren. Die durch Tabakrauch und Alkohol getriggerten Malignome treten meist in der Mundhöhle, im Hypopharynx und Larynx auf. Die häufigen durch Humane Papillomviren (HPV) induzierten Plattenepithelkarzinome finden sich nahezu ausschließlich im Oropharynx.

Wir befassten uns mit CMTM6, das für eine Immuncheckpoint-Therapie entscheidende Protein PD-L1 stabilisiert bzw. ein entsprechendes Therapieansprechen in anderen Malignomen positiv beeinflusst. Bislang ist über die prognostische und prädiktive Bedeutung von CMTM6 in HNSCC wenig bekannt. In einem ersten Schritt wurde deshalb in einem retrospektiven Ansatz die Immunexpression von CMTM6 in Tumorzellen und assoziierten Immunzellen in einer HNSCC Kohorte kaukasischer Patienten untersucht.

Ziel dieser Arbeit war es, mittels Immunhistochemie den Einfluss der CMTM6-Expression auf Tumorzellen und assoziierten Immunzellen in einem Cisplatin-behandelten Kollektiv zu untersuchen und die Ergebnisse mit dem Gesamtüberleben der 95 HNSCC-Patienten in einem 6-jährigen Erhebungszeitraum zu korrelieren.

Es konnte gezeigt werden, dass der CPS von CMTM6 signifikant mehr exprimiert ist in HPV-assoziierten Karzinomen, Mundhöhlen- und Oropharynxkarzinomen. Weitere klinische Parameter (Patientenalter, Geschlecht, Tumorstadien, Grading und Noxen-Assoziation) zeigten keinen Zusammenhang mit der CMTM6-Expression.

Eine hohe CMTM6-Expression korrelierte positiv mit der Anzahl tumorinfiltrierender Lymphozyten, welche in HPV-assoziierten Karzinomen laut Literatur für ein besseres Gesamtüberleben stehen. Es konnten keinen signifikanten Zusammenhang in der Expression von CMTM6 und PD-L1 nachgewiesen werden.

Im Gegensatz zur Datenlage in der Literatur kommt diese Arbeit zu dem Schluss, dass ein signifikanter Überlebensvorteil entsteht, wenn Kopf-Hals-Tumore eine hohe Expression von CMTM6 aufweisen.

Inhaltsverzeichnis

Gutachter	II
Widmung.....	III
Thesen.....	IV
Inhaltsverzeichnis	VI
Abkürzungsverzeichnis.....	IX
Abbildungsverzeichnis	X
Tabellenverzeichnis	X
1 Einleitung.....	1
1.1 Epidemiologie der Kopf-Hals-Karzinome.....	1
1.2 Ätiopathogenese	1
1.3 Therapie.....	3
1.4 Die Bedeutung von programmed death-ligand 1.....	7
1.5 Die Rolle von CKLF-like MARVEL transmembrane domain containing Protein 6.....	7
1.6 Zielstellung.....	9
2 Material und Methoden	10
2.1 Patientenkollektiv und Gewebeproben	10
2.2 Immunhistochemische Färbung	11
2.2.1 Anfertigung von Gewebeschnitten	11
2.2.2 Durchführung der immunhistochemischen Färbung.....	12
2.2.3 CMTM6 und PD-L1 Antikörper	12
2.3 Auswahl der Proben und lichtmikroskopische Auswertung	13
2.3.1 Lichtmikroskopische Auswertung	13
2.3.2 Auswahl des Tumormaterials.....	13
2.3.3 Heterogenität der Immunfärbung von CMTM6 und PD-L1	13
2.3.4 Tumorinfiltrierende Lymphozyten	15

2.4	Immunhistochemische Auswertung.....	16
2.4.1	Allgemeines Vorgehen	16
2.4.2	Kombinierter Positivitäts-Score	17
2.4.3	Tumor Proportion-Score	17
2.4.4	Inflammatorische Zellen.....	18
2.5	Molekulare Analytik p16-positiver Fälle.....	20
2.6	Metaanalyse	20
2.7	Statistische Auswertung	20
3	Ergebnisse.....	21
3.1	Gesamtkollektiv Analyse.....	21
3.2	Alters- und Geschlechtsverteilung	21
3.3	Tumorlokalisierung und Klassifikation.....	22
3.3.1	Tumorlokalisierung.....	22
3.3.2	Tumorklassifikation und -grad	22
3.4	Noxen-assoziierte Karzinome	25
3.5	HPV-assoziierte Karzinome und Verteilung der HPV-Typen	25
3.6	CMTM6- und PD-L1-Expression.....	26
3.6.1	CMTM6-Expression für den TPS.....	27
3.6.2	CMTM6-Expression für den CPS.....	27
3.6.3	IC-Score in Abhängigkeit der CMTM6-Expression.....	27
3.6.4	PD-L1-Expression für den CPS	28
3.6.5	Assoziation von CMTM6 CPS und PD-L1 CPS	28
3.6.6	Tumorinfiltrierende Lymphozyten	29
3.7	Klinisch-pathologische Parameter in Bezug auf die CMTM6-Expression.....	29
3.8	Korrelationsanalyse	30
3.9	Überlebensanalysen	31

3.9.1	Gesamtüberleben.....	31
3.9.2	Gesamtüberleben Subgruppenanalysen.....	32
4	Diskussion.....	38
4.1	Die Rolle von CMTM6	38
4.2	Methodendiskussion	39
4.3	Ergebnisdiskussion.....	42
4.3.1	Klinische Parameter des HNSCC-Kollektiv.....	43
4.3.2	Koexpression von CMTM6 und PD-L1.....	44
4.3.3	Heterogenität innerhalb der HNSCCC	45
4.3.4	In welcher Beziehung stehen CMTM6 und HPV?.....	45
4.3.5	Der Einfluss von CMTM6 auf die tumorinfiltrierenden Lymphozyten.....	46
4.3.6	Überlebenszeitanalysen	47
5	Zusammenfassung.....	49
6	Literaturverzeichnis.....	50
	Danksagung.....	54
	Lebenslauf.....	55
	Eidesstattliche Versicherung	56

Abkürzungsverzeichnis

CMTM6	CKLF-like MARVEL transmembran domain-containing 6
CPS	kombinierter Positivitäts-Score
CRC	Kolorektales Karzinom
CUP	cancer of unknown primary
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EBV	Epstein-Barr-Virus
ED	Erstdiagnose
EGFR	Epidermal-growth-factor-receptor
EMT	epitheliale-mesenchymale Transition
FFPE	Formalin-fixiert, in Paraffin eingebettet
ggf.	gegebenenfalls
GY	Gray
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HE	Hämatoxylin-Eosin
HNSCC	Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereichs
HPF	hochauflösende Gesichtsfelder
HPV	Humanes Papillomavirus
IC	inflammatorischen Zellen
ICI	Immun-Checkpoint-Inhibitoren
IHC	immunhistochemische Färbung
INF	Interferone
JÜR	Jahres-Überlebensrate
mögl.	mögliche
PD-1	programmed death-receptor 1
PD-L1	programmed death-ligand 1
PE	Probe-Exzision
pTNM	pathologische Tumorklassifikation
R0-Status	Tumorfremie Resektion
R1-Status	inkomplette Tumorresektion
RCT	Radiochemotherapie
TIL	Tumorerfiltrierende Lymphozyten
TME	Tumormikromilieu
TPS	Tumor Proportion-Score
zw.	zwischen

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Flow Chart zur Behandlungsempfehlung von rezidivierendes/metastasierendes HNSCC	6
Abbildung 2: Heterogenität der Immunfärbung von CMTM6 und PD-L1.	14
Abbildung 3: Morphologie der Karzinome in Abhängigkeit vom HPV-Status	16
Abbildung 4: IHC-Färbung für CMTM6 und PD-L1	19
Abbildung 5: Absolute Häufigkeiten der anatomischen Tumorlokalisationen	22
Abbildung 6: Absolute Häufigkeiten der pathologischen Tumorstadien	23
Abbildung 7: Absolute Häufigkeiten des Nodalstatus (nach der 8. Auflage der TNM-Klassifikation)	24
Abbildung 8: Gesamtüberleben des Kollektivs in Abhängigkeit des CMTM6 CPS.....	32
Abbildung 9: Gesamtüberleben der Tumorstadien in Abhängigkeit des CMTM6 CPS	33
Abbildung 10: Gesamtüberleben der Tumorstadien pT1+pT2 und pT3+pT4	34
Abbildung 11: Gesamtüberleben für Tumore in Mundhöhle + Oropharynx in Abhängigkeit von CMTM6 CPS	34
Abbildung 12: Gesamtüberleben HPV-positive Karzinome in Abhängigkeit der CMTM6-Expression	35
Abbildung 13: Gesamtüberleben PD-L1 positiver Fälle	37
Abbildung 14: Gesamtüberleben PD-L1 negativer Fälle	37

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: TNM-Klassifikation der Kopf-Hals-Tumore (vereinfacht)	3
Tabelle 2: Immunhistochemische Antikörper für CMTM6 und PD-L1	12
Tabelle 3: Lokalisation der Metastasen zum Zeitpunkt der Erstdiagnose	24
Tabelle 4: Differenzierungsgrad der Karzinome	25
Tabelle 5: Lokalisation der HPV-assoziierten Fälle	25
Tabelle 6: Klinisch-pathologische Daten des Gesamtkollektivs	26
Tabelle 7: CMTM6-Expression für den TPS	27
Tabelle 8: CMTM6-Expression für den CPS	27
Tabelle 9: PD-L1-Expression für den CPS.....	28
Tabelle 10: Kontingenztafel nach der CMTM6-Expression	29
Tabelle 11: Bivariate Korrelationsanalyse für CMTM6 CPS	31

1 Einleitung

1.1 Epidemiologie der Kopf-Hals-Karzinome

Nicht-kutane Plattenepithelkarzinome im Kopf-Hals-Bereich (HNSCC) stellen eine heterogene Gruppe maligner Neoplasien mit Manifestation in Mundhöhle, Rachen, Speicheldrüsen, Larynx sowie auf den Lippen dar. Histologisch betrachtet handelt es sich zu 90 % um Plattenepithelkarzinome, welche die dominierende Tumorentität in diesem Bereich bildet (Weichert et al. 2018). Weltweit zählt das HNSCC mit einer Inzidenz von ca. 800.000 Fällen pro Jahr zu den acht häufigsten Krebserkrankungen (Sung et al. 2021). Im Jahr 2018 lag die Inzidenz in Deutschland für HNSCC insgesamt bei knapp 14.300 Neuerkrankungen und ist bei Männern auf Platz 9 (3,2 %), bei Frauen auf Platz 17 (1,4 %) aller Tumorerkrankungen. Die relative 5-Jahres Überlebensrate (JÜR) betrug 2018 bei den Männern 52 % und bei den Frauen 62 % (Robert Koch-Institut 2019).

1.2 Ätiopathogenese

Die Hauptrisikofaktoren in Deutschland für die Entstehung eines HNSCC sind einerseits chronischer Tabak- und Alkoholkonsum sowie andererseits die Infektion mit onkogenen Viren (Weichert et al. 2018). In Abhängigkeit von dieser Ätiopathogenese manifestieren sich die Tumore in gewissen anatomischen Kompartimenten, häufig auch mit dem entsprechenden typischen histologischen Subtyp: Die durch Tabakrauch und Alkohol getriggerten Malignome treten meist in der Mundhöhle, im Hypopharynx und Larynx auf (Johnson et al. 2020). Für Lippenkarzinome sind zusätzlich die Risikofaktoren der Hauttumore mitverantwortlich, insbesondere die Ultraviolettstrahlungs-Exposition ist hier zu nennen (Marur und Forastiere 2016). Diese sogenannten Noxen-assoziierten Karzinome zeigen die variantenreiche Morphologie „konventioneller“ verhornter Plattenepithelkarzinome, deren generelle Gemeinsamkeit die in Nestern gelagerten atypischen Plattenepithelien innerhalb eines desmoplastischen Stromas ist. Ein weiterer ätiopathogenetischer Faktor stellt das Kauen der Betelnuss in den asiatischen Ländern sowie Indien dar. Schätzungsweise 10 % der Weltbevölkerung konsumieren die Betelnuss als Genussprodukt bzw. Gesellschaftsdroge. Mehrere Studien belegen, dass beim Kauen freigesetzte Substanzen (Alkaloide und Arecoline) karzinogen im Bereich der Mundschleimhaut wirken (Sharan et al. 2012).

Die in der Bundesrepublik Deutschland eher seltenen durch das Epstein-Barr-Virus (EBV) bedingten Karzinome sind im Nasopharynx lokalisiert; histologisch finden sich klassischerweise reichlich intra- und peritumorale Lymphozyten mit Verlust der Keratinisierung in den polymorphen Tumorzellen.

Die häufigen durch Humane Papillomviren (HPV) induzierten Plattenepithelkarzinome finden sich nahezu ausschließlich im Oropharynx und präsentieren eine basaloide Morphologie. Diese imponiert mit wenig bis mäßig polymorphen Zellen, schmalen Zytoplasma, Mitosereichtum, Kernhyperchromasie, häufigen Nekrosen und frequent peripherer Palisadenstellung der Zellkerne; die Verhornung der Tumorzellen ist gering ausgeprägt oder komplett fehlend. Eine Infektion der Mukosa des Oropharynx, schwerpunktmäßig am unverhornten Plattenepithel der tonsillären Oberfläche, mit gewissen HPV-Typen kann krebsauslösend (onkogen) sein. Aufgrund ihres onkogenen Potenzials werden diese HPV-Hochrisikotypen den Niedrigrisikotypen gegenübergestellt. Bei persistierenden Infektionen mit HPV-Hochrisikotypen steigt das Risiko für eine zufällige Integration des Virusgenoms in das Erbgut infizierter Epithelzellen (Alimena et al. 2022). Im Falle der mukosalen Zellen der Oropharynxkarzinome ist die vorherrschende Variante der Hochrisiko-Typ 16. Des Weiteren finden sich hier die HPV-Typen 18, 33 und 52 (Michaud et al. 2014). In der Studie von Sritippho et al. wird das Protein p16 eindeutig als Surrogat-Marker als HPV-Hochrisikotyp identifiziert (Sritippho et al. 2016).

Die unterschiedliche prognostische Bedeutung der Noxen- und HPV-assoziierten Karzinogenese findet aktuell noch keine hinreichende Berücksichtigung im klinischen Setting, insbesondere nicht in (neo-) adjuvanten Behandlungsregimen. Gleichzeitig resultierte die bessere Prognose HPV-assoziiertes oropharyngeales HNSCCs in einer Loslösung dieser Karzinome von den restlichen HNSCCs dieser Lokalisation in eine eigene TNM-Klassifikation in der 2017 publizierten 8. Version der UICC-Systematik (Wittekind 2020). Eine Neuerung im Rahmen dieser Klassifikation für das diagnostische Prozedere ist - neben eines adaptierten Stagings - das Grading virusassoziierter-Tumore: In der WHO-Malignitätsgraduierung wurde das aggressive Potential HPV-assoziiertes Oropharynxkarzinome bislang anhand der Tumormorphologie mittels der histologischen Differenzierung (gut, G1; mäßig, G2; niedrig, G3) eingruppiert. Dieses konventionelle Tumorgrading entfällt mit der aktuellen UICC-Klassifikation, um die Diskrepanz von typischerweise geringem Tumorgrad und guter Prognose

aufzulösen. Zukünftig sollen alle HPV-assoziierten oropharyngealen HNSCCs als eigenständige Entität angesehen und im Grading als „p16-positiv“ verschlüsselt werden (Weichert et al. 2018).

1.3 Therapie

Die Therapie eines HNSCC ist generell, wie bei fast allen Tumoren, abhängig von der Lage, Größe und Ausdehnung des Primärtumors. Auch der Wille und der Allgemeinzustand der Patienten spielt in der Therapieentscheidung eine führende Rolle (S3-Leitlinie Mundhöhlenkarzinom). Wie alle Karzinome werden auch die HNSCC mittels der TNM-Klassifikation eingeteilt, welche in vereinfachter Form für p16-negative Plattenepithelkarzinome des Oropharynx in Tabelle 1 exemplarisch dargestellt wird.

Tabelle 1: TNM-Klassifikation der Kopf-Hals-Tumore (vereinfacht)

Stadium	Beschreibung
Tis	Carcinoma in situ
T1	Größte Ausdehnung \leq 2 cm
T2	Ausdehnung $>$ 2 cm aber nicht \leq 4 cm
T3	Ausdehnung $>$ 4 cm oder Ausbreitung zur linguale Oberfläche der Epiglottis
T4	Primärtumor infiltriert in benachbarte Strukturen
N0	Keine Lymphknotenmetastasen
N1	Solitäre, ipsilaterale Lymphknotenmetastase \leq 3 cm
N2a	Solitäre, ipsilaterale Lymphknotenmetastase $>$ 3 cm, aber \leq 6 cm
N2b	Mehrere ipsilaterale Lymphknotenmetastasen \leq 6 cm
N2c	Bi- oder kontralaterale Lymphknotenmetastasen \leq 6 cm
N3	Lymphknotenmetastase/-n $>$ 6 cm
M0	Keine Fernmetastase/-n
M1	Fernmetastase/-n

(Lippe, Mundhöhle, Pharynx, große Speicheldrüsen), modifiziert nach TNM UICC 8. Auflage (Wittekind 2020)
Abkürzungen: T, Tumor; N, Nodalstatus; M, Metastasierung

Die Tumorklassifikation bedingt das prä- und postoperative Therapiemanagement, welches interdisziplinär im Rahmen regelmäßiger Tumor-Konferenzen erarbeitet wird. Während bei kleineren Tumoren (T1 und T2) die chirurgische Operation und die Strahlentherapie im kurativen Setting gleichwertig sind, empfiehlt die aktuell gültige S3-Leitlinie für Mundhöhlenkarzinome (Version 3.0, März 2021) federführend die „Deutsche Gesellschaft für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie“ bei Patienten mit lokal begrenzten Primärtumoren und positivem Nodalstatus (pN1 Kategorie der Stadien T1 und T2) eine adjuvante Radiochemotherapie (RCT). Entsprechende Empfehlung gilt unabhängig vom Nodalstatus auch für weiter fortgeschrittene Karzinome der Kategorien T3 und T4. Eine ausgedehnte Resektion des Primärtumors ist nach wie vor angezeigt. Ist eine tumorfreie Resektion (R0-Status) nicht erreicht worden (R1-Status), muss gegebenenfalls (ggf.) nachreseziert werden. Wie in der oben angeführten aktuellen S3-Leitlinie beschrieben, profitieren Patienten unter 60 Jahren besonders von einer Kombinationstherapie aus Strahlen- und Chemotherapie. Das derzeit noch aktuelle systemtherapeutische Erstlinienprogramm ist das sogenannte EXTREME-Schema - bestehend aus Cisplatin, 5-Fluorouracil und Cetuximab (Hoffmann 2022). Die Strahlentherapie wird in mehreren Einzeldosen verabreicht: im konventionellen Schema fraktioniert 1,8 – 2,0 Gray (GY) täglich an 5 Tagen pro Woche über einen Monat. Alternativ existieren akzelerierte (>10 Gy/Woche) oder hyperfraktionierte (1,1 – 1,2 Gy, 2-mal täglich) Schemata. Der Effekt gegenüber einer alleinigen Strahlentherapie für diese Gruppe stieg auf 22-24 %. Die 60- bis 70-Jährigen Patienten mit vergleichbaren Tumorstadien profitierten mit einer Steigerung des Überlebensvorteils von 12 % (S3-Leitlinie Mundhöhlenkarzinom).

Das Chemotherapeutikum mit dem höchsten Stellenwert ist nach wie vor Cisplatin. Cisplatin, auch cis-Diamindichlorplatin genannt, ist eine metallische Koordinationsverbindung mit quadratisch-planarer Konformation und hat ein Molekulargewicht von 301,1 g/mol. Es fördert die Bildung von Desoxyribonukleinsäure (DNA)-Quervernetzungen und sorgt dementsprechend für Punktmutationen und Hemmung der Telomerase-Aktivität in den Tumorzellen (Hartmann et al. 2018). Bei unzureichender Nierenfunktion kann alternativ auch Mitomycin C (zytotoxisches Antibiotikum mit alkylierender Schädigung der DNA) oder Carboplatin gegeben werden (bei bereits bekannter Niereninsuffizienz). Ein weiterer Kombinationspartner zur Alternative oder Augmentation von Cisplatin in der RCT ist Cetuximab. Cetuximab ist ein monoklonaler Antikörper, welcher auf den epidermal-growth-factor-receptor (EGFR)

inhibitorisch wirkt. Zusammen mit Cisplatin ist Cetuximab derzeit der einzige Ansatz in der First-Line Therapie im kurativen Ansatz zur Behandlung von HNSCC im lokal fortgeschrittenen Tumorstadium. Trotz moderner Therapie erleiden noch ca. 40 % der in kurativer Intention adjuvant behandelten Patienten einen Progress und bei ca. 25 % kommt es zu Fernmetastasen (Grün et al. 2019).

Daher ist es wichtig, effektivere und nebenwirkungsärmere Therapien zu entwickeln. In den letzten 20 Jahren fokussierte sich die Wissenschaft bei der Bekämpfung und Progression von Tumoren immer mehr auf das Immunsystem (Peng et al. 2021). Es wurde erkannt, dass Malignome in der Lage sind, dem Immunsystem bei der Entstehung und Erkennung zu entkommen. Derzeit werden in vielen wissenschaftlichen Arbeiten Oberflächenmoleküle auf den Membranen von Tumoren identifiziert, sogenannte Immun-Checkpoint-Proteine, welche in malignen Tumoren hochreguliert werden und eine inhibitorische Funktion auf das Immunsystem ausüben. Somit entfliehen die Tumorzellen einer Eliminierung durch das Immunsystem (sogenannte Immunevasion) (Boussiotis 2016).

Die bereits als Therapie-Optionen etablierten Immun-Checkpoint-Inhibitoren (ICI) sorgen für einen vielversprechenden Ansatz in der Therapie verschiedener Krebserkrankungen und sind im HNSCC bei Patienten mit rezidivierendem und/oder metastasiertem Karzinom zugelassen. Die Erstlinienbehandlung von rezidivierenden bzw. metastasierenden Karzinomen sollte mit Pembrolizumab durchgeführt werden, ein ICI (humanisierter IgG4-Antikörper) gegen den sogenannten programmed death-receptor 1 (PD-1). Der folgende Flow-Chart visualisiert noch einmal das Therapieschema bei rezidivierenden und/oder metastasierten Karzinomen im Kopf-Hals-Bereich (Johnson et al. 2020).

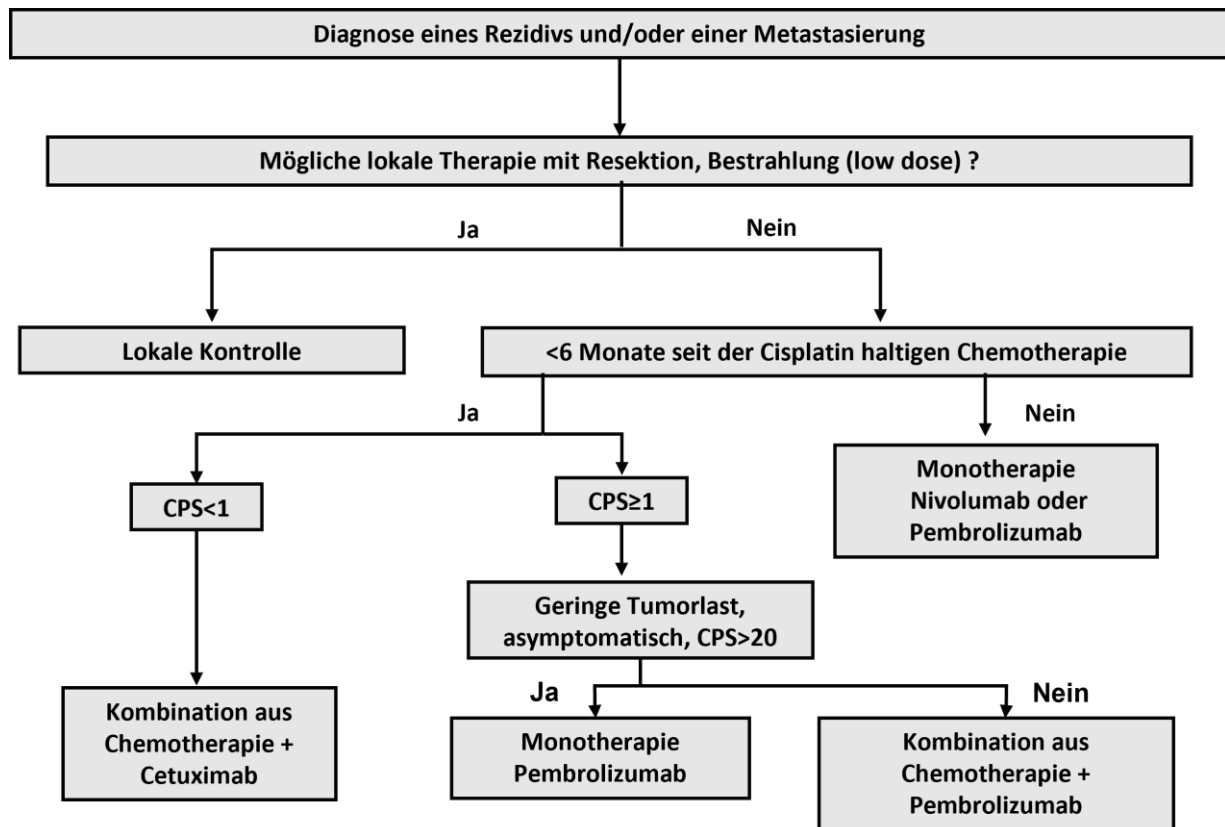


Abbildung 1: Flow Chart zur Behandlungsempfehlung von rezidivierendes/metastasierendes HNSCC
 Nach der Diagnose eines rezidivierenden und/oder metastasierenden Karzinoms im Kopf-Hals-Bereich erhalten Patienten, die für eine lokale Therapie geeignet sind eine Resektion, Bestrahlung oder Bestrahlung mit begrenzter Dosis und werden anschließend weiter beobachtet. Patienten, die für eine solche Therapie nicht in Frage kommen, erhalten dennoch eine System-Therapie. Pembrolizumab erhalten diejenigen mit einem CPS ≥ 1 für PD-L1-positive Tumorzellen als Monotherapie mit asymptomatischem Verlauf, geringer Tumorlast und einem CPS > 20 . Patienten mit einem CPS < 20 , hoher Tumorlast und symptomatischen Verlauf erhalten zusätzlich eine Kombination mit einer platinhaltigen CT. Zeigt sich keine Expression im Tumorgewebe für PD-L1 (CPS < 1), ist eine Therapie mit Cisplatin und Cetuximab angezeigt. Patienten, die einen Rückfall unter/nach? platinhaltigen Therapie erleiden, sollten eine Monotherapie mit Pembrolizumab oder Nivolumab bekommen (Johnson et al. 2020).

Abkürzungen: PD-L1, programmed death Ligand 1; CPS, kombinierter Positivitäts-Score ; CT, Chemotherapie

Allerdings spricht nicht jeder Patient auf diese Therapien an und es gibt weiterhin Forschungsbedarf, um neue Biomarker zu identifizieren und bekannte Biomarker in der Anwendung zu validieren, um vorhersagen zu können, welche Patienten am wahrscheinlichsten von einer ICI-Therapie profitieren würden (Becker et al. 2022).

1.4 Die Bedeutung von programmed death-ligand 1

Der programmed death-ligand 1 (PD-L1) ist ein Oberflächenprotein, welches in Tumorzellmembranen lokalisiert ist. Es kommt ebenso in Lymphozyten und weiteren Immunzellen vor (Boltz). Die Expression von PD-L1 wird durch bestimmte Zytokine [Interferone (INF)] (IFN- α und IFN- γ) beeinflusst. Wenn nun der PD-1 einer T-Zelle mit dem passenden PD-L1 einer Tumorzelle interagiert, wird die Apoptose der T-Zelle eingeleitet. Indem nun die zytotoxische Funktion der T-Zelle inhibiert ist, kann die Krebszelle dem Angriff des Immunsystems entkommen (Perri et al. 2020). Die Interaktion von Rezeptor und seinem Liganden ist der wichtigste adaptive Prozess von HNSCC-Tumoren, um dem Immunsystem zu entkommen. Somit spielt dieser Signalweg eine entscheidende Rolle bei der Tumorprogression und dem Gesamtüberleben der Patienten (Cristina et al. 2019).

Dennoch wird PD-L1 in der Literatur kontrovers diskutiert. In manchen Entitäten wird die PD-L1-Expression für eine positive und in anderen Entitäten für eine negative Gesamtprognose für das Überleben beschrieben (Pai et al. 2019). Es scheint mehrere Faktoren zu geben, die das quantitative Vorkommen von PD-L1 beeinflussen. In Betracht kommen: Lokalisation, Lymphknotenstatus (LK), Alter, Heterogenität des Tumors, Geschlecht und Risikofaktoren (Perri et al. 2020). Wenngleich eine hohe PD-L1-Expression, welche im klinischen Alltag für das HNSCC anhand des kombinierten Positivitäts-Scores (CPS) angegeben wird, allgemein ein Ansprechen auf Immunonkologika vorhersagt, treten einerseits Therapieversagen in PD-L1-positiven Karzinomen und andererseits Langzeit-Therapieerfolge in PD-L1-negativen Karzinomen auf (Döscher et al. 2016). Daher reicht PD-L1 als alleiniger prädikativer Marker nicht aus, um zuverlässig das Ansprechen für ICIs vorher zu sagen. Zukünftig betrachtet, wäre ein zuverlässiger Biomarker wünschenswert, der den Vorhersagewert und ggf. eine mögliche (mögl.) Resistenz für eine Therapie identifiziert und Rückschlüsse auf das Ansprechen des Tumors bietet (Cristina et al. 2019).

1.5 Die Rolle von CKLF-like MARVEL transmembrane domain containing Protein 6

CKLF-like MARVEL transmembrane domain containing Protein 6 (CMTM6) gehört zu der Chemokin-ähnlichen-Faktor-Gen Superfamilie 1-8. Es ist auf dem Chromosom 3p22 lokalisiert

und ein Typ 3 Transmembranprotein mit einer MARVEL-Domäne, welche aus 4 Transmembran-Helices besteht. Proteine der MARVEL-Domäne sind wichtige Regulatoren im Transport von Transmembranproteine mit einer Größe von 20 Kilodalton (Zhao et al. 2020). Eine beschriebene Funktion von CMTM6 ist die posttranslationale Stabilisierung von PD-L1, indem es dessen lysosomalen Abbau verhindert (Chen et al. 2020). In diesem Zusammenhang wird das mittels Immunhistochemie quantifizierte CMTM6 im nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom, dem tödlichsten Malignom weltweit und Paradebeispiel für die Erfolge der ICIs, als positiver prädiktiver Biomarker für eine ICI-Therapie beschrieben (Albanes et al. 2022). Weiterhin fand die Arbeitsgruppe um Mohapatra et al. heraus, dass CMTM6 ein wichtiger Faktor bei der Inversion von Immunzellen ist (Mohapatra et al. 2021). Die Autoren identifizierten CMTM6 als Schlüsselmediator für eine (erworbene) Cisplatin-Resistenz im HNSCC, was sie in ihren Zellkultur-Experimenten auf eine CMTM6-bedingte Aktivierung des kanonischen WNT-/ β -Catenin-Signalwegs zurückführen (Mohapatra et al. 2021). Eine 2020 veröffentlichte Arbeit von Chen et al. brachte CMTM6 in dieser Tumorentität mit verstärkter epithelial-mesenchymaler Transition (EMT) und gesteigerter Immunevasion in Verbindung, was mit einem schlechteren Gesamtüberleben CMTM6-positiver Patienten in diesem asiatischen Kollektiv einherging (Chen et al. 2020). Wenngleich eine hohe (Protein-) Expression des erst 2014 entdeckten CMTM6 in gewissen Tumorentitäten, z.B. dem Glioblastom, mit einer schlechten Prognose assoziiert, so ist seine Expression beispielsweise im Kolorektal- oder Ovarialkarzinom ein günstiger Marker für das Überleben (Zhao et al. 2020), (Yin et al. 2022). Ferner scheint das Molekül das Ansprechen auf verschiedene Chemotherapeutika positiv zu beeinflussen, wie Peng et al. für das kolorektale Karzinom (CRC) und Huang et al. für das hepatozelluläre Karzinom (HCC) in ihren Arbeiten berichten (Peng et al. 2021; Huang et al. 2022). Im CRC wird hierbei eine CMTM6-vermittelte Aktivierung des Tumormikromilieus, im HCC eine Inaktivierung des Tumorsuppressors Retinoblastom durch die Stabilisierung des Cyclin-abhängigen Kinase-Inhibitors 1 (p21) als Ursache für die gute Chemosensitivität angenommen.

1.6 Zielstellung

Ausgehend davon, dass Patienten mit einem fortgeschrittenem HNSCC unter Cisplatin-Therapie einen Progress entwickeln und sich dadurch für eine Anti-PD-L1-Behandlung qualifizieren – liegt das Ansprechen der Therapie mit Immun-Checkpoint-Inhibitoren (ICI) um die 20 %. Dies ist zwar deutlich besser als bei herkömmlichen Zweitlinienschemata, dennoch gilt es die Effektivität der Therapien zu steigern, um die Patienten zu selektionieren, die nicht von ICIs profitieren (Döscher et al. 2016).

Daher bedarf es weiterer prädikativer Marker, um zuverlässig das Ansprechen für ICIs vorher zu sagen.

Wir befassten uns mit CMTM6, das für eine ICI-Therapie entscheidende Protein PD-L1 stabilisiert bzw. ein entsprechendes Therapieansprechen in anderen Malignomen positiv beeinflusst. Außerdem ist bislang über die prognostische und prädiktive Bedeutung von CMTM6 in HNSCC wenig bekannt. In einem ersten Schritt wurde deshalb in einem retrospektiven Ansatz die Immunexpression von CMTM6 in Tumorzellen und assoziierten Immunzellen in einer HNSCC Kohorte kaukasischer Patienten untersucht.

Um unsere Hypothese zu untermauern, dass eine CMTM6-Überexpression einen günstigen prognostischen Einfluss auf das Überleben von HNSCC-Patienten hat, beleuchteten wir folgende Aspekte:

- 1) Frequenz der Immunexpression von CMTM6 im kaukasischen HNSCC
- 2) Assoziation von CMTM6 mit PD-L1
- 3) Bedeutung der CMTM6-Expression für das Gesamtüberleben
- 4) Einfluss des CMTM6 auf das Tumormikromilieu im HNSCC

2 Material und Methoden

2.1 Patientenkollektiv und Gewebeproben

Das Ausgangskollektiv für unsere retrospektive Analyse bildeten HNSCC-Patienten, deren Tumormaterial im Einschlusszeitraum von März 2014 bis Juni 2021 im Institut für Pathologie der Universitätsmedizin Rostock untersucht worden war. Dieses Kollektiv bestand ausschließlich aus internen, in der Universitätsmedizin Rostock behandelten Fälle mit entsprechend zur Verfügung stehenden klinischen Daten. Patienten wurden in die Studie eingeschlossen, wenn 1. histologisch ein HNSCC der Lokalisation Mundhöhle, Oropharynx, Hypopharynx oder Larynx und/oder in Form von lokale(n) Halslymphknotenmetastase(n) gesichert war, 2. ausreichend Tumormaterial vom Zeitpunkt vor Therapiebeginn (= Therapie-naiv) für Forschungszwecke zur Verfügung stand, 3. eine adjuvante RCT als Erstlinien-Therapie zeitnah nach der Entnahme des histologischen Materials aufgrund klinischer Kriterien durchgeführt wurde und 4. der klinische Verlauf bis zur letzten Konsultation (last follow-up) bzw. Sterbedatum bekannt war. Das Krebsregister Mecklenburg-Vorpommern stellte alle relevanten Informationen Datenrecht-konform mittels Patienten-individueller Verschlüsselung für unsere Studie in dem oben genannten Einschlusszeitraum zur Verfügung. Klinische Daten, wie Rezidiv- und Sterbedatum, Therapieart, pathologische Tumorklassifikation (pTNM) und der Differenzierungsgrad konnten somit ermittelt werden. Über das klinikinterne Patientenmanagementsystem SAP® wurden die Alkohol- und Nikotinanamnese mittels Durchsicht der Pflegedokumentation aus der Otto-Körner-HNO Klinik und der Klinik für Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie, vervollständigt. Der p16-Status wurde ebenfalls im SAP® über die dokumentierten Pathologiebefunde recherchiert.

Anhand dieser Daten konnte das Gesamtüberleben (OS) errechnet und in das Microsoft® Office Excel-Programm gepflegt werden. Das OS (in Monaten) wurde definiert vom Tag der Primärdiagnose bis zum Tod. Das Ende des Nachverfolgungszeitraums (follow-up) hinsichtlich des OS war Juli 2022. Patienten, bei denen das primäre Endpunktereignis bis zum Ende des Beobachtungszeitraums nicht eintrat oder aus der Studie ausschieden, wurden zensiert. Nichtraucher wurde definiert als Nie-Raucher oder ≥ 10 Jahre Nikotinabsenz. Material aus Tumorresektaten wurden gegenüber dem Material aus Biopsien, z.B. zur initialen Diagnosesicherung, bevorzugt. Gemäß den Einschlusskriterien wählten wir bei Patienten mit mehrzeitigem Materialeingang, typischerweise aufgrund eines Rezidivs, das dem vor RCT-

Start zeitlich unmittelbar vorangegangene Material, was auch rezidierte Tumore miteinschloss. Fälle mit einer Diagnosestellung vor 2017 wurden gemäß der damals gültigen 7. Edition der TNM-Klassifikation eingruppiert. Fälle mit einer Diagnosestellung nach 2017 wurden nach der aktuell geltenden 8. Edition der TNM-Klassifikation befundet. Im Sinne der Kollektiv-Harmonisierung wurden p16-positive Karzinome des Oropharynx mit einer Diagnosestellung vor 2017, welche die Kriterien des in der 8. Edition der TNM-Klassifikation neu eingeführten Subtyps des „p16-positiven Oropharynxkarzinoms“ erfüllten, hinsichtlich ihres Nodalstatus unter Anwendung der 8. Edition re-klassifiziert. Alle Patienten wurden pseudorandomisiert. Sämtliche Vorgaben des Datenschutzes der Universitätsmedizin Rostock wurden stets eingehalten. Die Studie wurde durch die Ethikkommission der medizinischen Fakultät der Universitätsmedizin Rostock angenommen und mit der Nummer A-2022-0120 registriert.

2.2 Immunhistochemische Färbung

Die Immunhistochemische Färbung (IHC) ist eine etablierte Spezialfärbemethode, welche sich in der Histologie zur gezielten Darstellung definierter Zielstrukturen eines bestimmten Markers eignet. Mit ihr lassen sich hochspezifische Proteinmarker für die Tumordiagnostik und Klassifikation nachweisen. Die Methode basiert auf der Affinität eines Primärantikörpers zu einem bestimmten Epitop, einem intra- oder extrazellulären Antigen. In unserer Studie verwendeten wir die Avidin-Biotin-Komplex-Methode. Sie basiert auf der Affinität des Biotins für Avidin, welches eine starke Bindung eingeht. Diese Bindung produziert einen braunen Farbumschlag der Ziel-Epitope.

2.2.1 Anfertigung von Gewebeschnitten

Zunächst wurden aus dem Archiv des Instituts für Pathologie der Universitätsmedizin Rostock die Hämatoxylin-Eosin (HE) gefärbten Gewebeschnitte aller potentieller Fälle herausgesucht. In Abhängigkeit vom klinischen Kontext lag das Gewebe entweder aufgrund einer diagnostischen Abklärung als Probe-Exzision (PE) oder infolge einer onkologisch-chirurgischen Therapie als Tumorsektat vor. Im ersten Schritt wurden sämtliche Präparate zur Evaluation von Tumorgehalt und Verteilung des assoziierten Stromas mikroskopiert. Sofern auf dem

Schnitt ausreichend Tumormaterial für weiterführende Untersuchungen vorhanden war, wurden im zweiten Schritt die entsprechenden Formalin-fixierten, in Paraffin eingebetteten (FFPE) Gewebeblöcke identifiziert. In Vorbereitung der immunhistochemischen Färbung wurden 2µm dicke Gewebeschnitte dieser Blöcke mittels eines Mikrotoms der Firma Leica® Biosystems (Nussloch GmbH, Deutschland) geschnitten, auf beschichtete Objektträger aufgetragen und über Nacht im Brutschrank getrocknet.

2.2.2 Durchführung der immunhistochemischen Färbung

Vor der Färbung mussten die FFPE-Gewebeschnitte einer Entparaffinierung und Rehydrierung, gefolgt von einer hitze-induzierten Epitopdemaskierung unterzogen werden. Dieses Verfahren wurde vollautomatisiert von dem Autostainer Link 48 der Firma AgilentDako® (Kalifornien, USA) vorbereitet. Die anschließende IHC-Färbung wurde mit einem Färbeautomaten der Firma Dako® und dem speziell für Kaninchen-Antikörper entwickelten Detektionssystem EnVision Flex (High pH Link; Code: K8000; AgilentDako®) durchgeführt.

2.2.3 CMTM6 und PD-L1 Antikörper

Die verwendeten Antikörper für die immunhistochemische Färbung von CMTM6 und PD-L1 werden in Tabelle 2 illustriert.

Tabelle 2: Immunhistochemische Antikörper für CMTM6 und PD-L1

Protein	Antikörper	Hersteller	Verdünnung	Vorbehandlung
CMTM6	Anti-CMTM6 [EPR23015-45]; Monoklonal von Kaninchen	abcam®	1:1000	EnVision Flex (High pH Link; Code: K8000; AgilentDako®
PD-L1	Anti-PD-L1, Klon 22C3; Monoklonal von Mäusen	Agilent®	1:50	EnVision Flex (High pH Link; Code: K8000; AgilentDako®

2.3 Auswahl der Proben und lichtmikroskopische Auswertung

2.3.1 Lichtmikroskopische Auswertung

Die lichtmikroskopische Evaluation der Proben erfolgte an HE-gefärbten Schnitten an einem Carl Zeiss® (Jena, Deutschland) Axioskop 50 Lichtmikroskop. Repräsentative Beispiele wurden zur Veranschaulichung mittels einer Axiocam 305 color Mikroskop-Kamera ebenfalls der Firma Zeiss® dokumentiert.

2.3.2 Auswahl des Tumormaterials

Die Entscheidung ganze Großflächenschnitte auf Objektträgern zu untersuchen, basiert darauf, dass das gesamte Tumormaterial und sein Färbeverhalten für die Protein-Expression von CMTM6 und PD-L1 beurteilt werden konnte. Wir gehen davon aus, dass es zu falsch negativen Ergebnissen kommen kann, wenn das Tumormaterial mit der TMA-Methode (Multigewebeblöcke, so genannte tissue microarrays = TMA) untersucht wird, bei der nur ein Ausschnitt des jeweiligen Tumorgewebes bewertet werden kann. Wie in Abschnitt 2.3.3 beschrieben, ist die Expression von CMTM6 und PD-L1 weitgehend heterogen im gesamten Tumormaterial verteilt. Darüber hinaus sind die Immunzellen im peritumoralen Stroma besser zu beurteilen und somit konnte das Scoring für den CPS und IC gewährleistet werden.

2.3.3 Heterogenität der Immunfärbung von CMTM6 und PD-L1

In nahezu allen Tumoren zeigte sich eine stark variierende Immunfärbung. Die Herausforderung war für uns, die heterogene Expression der unterschiedlichen Areale zu integrieren und daraus einen validen Scorewert zu ermitteln, um das gesamte Präparat repräsentativ abzubilden. Sowohl die Immunfärbung von CMTM6 als auch von PD-L1 wiesen diese Heterogenität innerhalb der Tumorpräparate auf.

Um dies exemplarisch zu veranschaulichen, haben wir in Abbildung 2 jeweils ein Beispiel für die Heterogenität der Immunfärbung für CMTM6 und PD-L1 dargestellt.

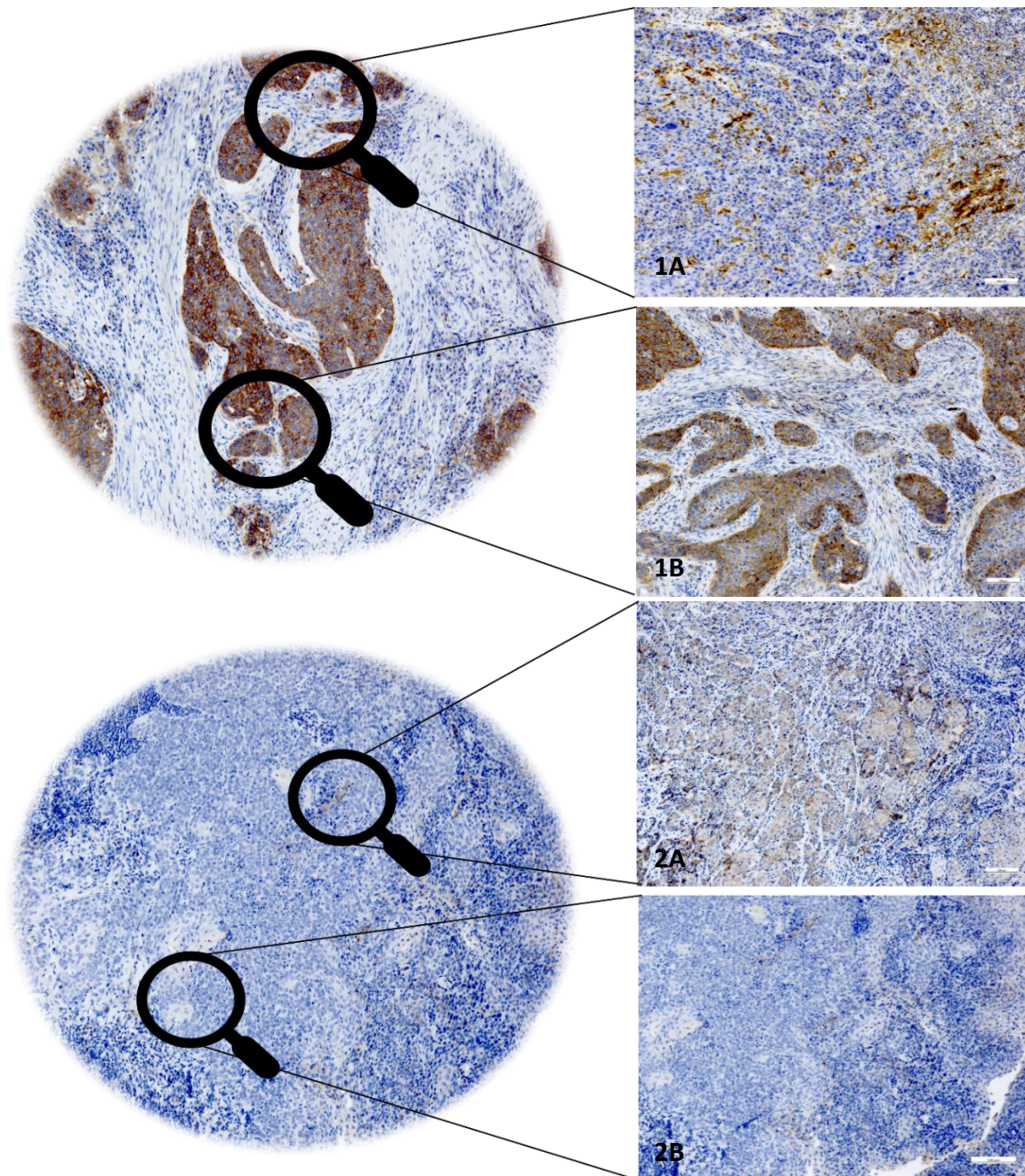


Abbildung 2: Heterogenität der Immunfärbung von CMTM6 und PD-L1.

Bild 1A stellt einen Abschnitt des Tumors dar, in dem vorherrschend die peritumoralen Immunzellen positiv auf CMTM6 reagieren und sich somit ein TPS < 50 aber ein CPS \geq 10 errechnet.

Bild 1B zeigt eine CMTM6 Färbung des gleichen Tumors bei der über 50 % der Tumorzellen im oberen Bildrand positiv reagieren (TPS > 50, „high“). Im unteren Bildrand sind deutlich weniger als 50 % der Tumorzellen positiv (TPS > 1, < 50; „low“).

Bild 2A und 2B zeigt zwei lokal unterschiedliche Abschnitte eines gemeinsamen Tumors mit der PD-L1 Färbung. **In Bild 2A** ist für PD-L1 der CPS \geq 1 „positiv“. Dies liegt vor allem an den positiv gefärbten peritumoralen Immunzellen.

In Bild 2B ist der CPS < 1 „negativ“ für die PD-L1 Färbung – weder Tumorzellen, noch peritumorale Immunzellen haben positiv auf die Färbung reagiert.

Abkürzungen: TPS, Tumor Proportion-Score; CPS, kombinierter Positivitäts-Score

2.3.4 Tumorinfiltrierende Lymphozyten

Allgemein existieren verschiedene Auswertschemata zur Beurteilung der Anzahl und Dichte der tumorinfiltrierenden Lymphozyten (TIL) im Tumorzentrum sowie im Bereich der Invasionsfront (Ribbat-Idel et al. 2021). In dieser Arbeit zählten wir Lymphozyten, Makrophagen/Histiozyten sowie dendritische Zellen zu den TIL und exkludierten übrige Immunzellen wie z.B. neutrophile Granulozyten oder Plasmazellen. Um eine valide, reliable und objektive Auswertung an der teils begrenzten Tumormenge zu gewährleisten, entschlossen wir uns für eine zweistufige Klassifikation der TIL: Fälle mit (nahezu) absenten oder wenigen TIL (in zweihundertfacher Vergrößerung < 3 TIL pro Gesichtsfeld) und Fälle mit mäßig vielen/reichlichen TIL (in zweihundertfacher Vergrößerung ≥ 3 TIL pro Gesichtsfeld). Daraus resultierten Fälle mit kaum/keinen TIL (Gruppe=0) und Fälle mit mäßigen/hohen TIL (Gruppe=1). Zur Vereinheitlichung der Auswertung der Gewebeproben, die sowohl aus Resektaten als auch Biopaten bestanden, ließen wir die beiden anatomischen Kompartimente von Tumorzentrum und Invasionsfront in die jeweiligen Eingruppierungen mit einfließen. Vor dem Hintergrund der schwer ermittelbaren, exakten Trennlinie dieser beiden Kompartimente verzichteten wir auf eine separate Beurteilung beider Regionen. Um unser Schema zu illustrieren, haben wir in Abbildung 3 vier repräsentative Beispiele von TIL dargestellt (HPV-positives und -negatives Tumorgewebe der Gruppe 0 und Gruppe 1).

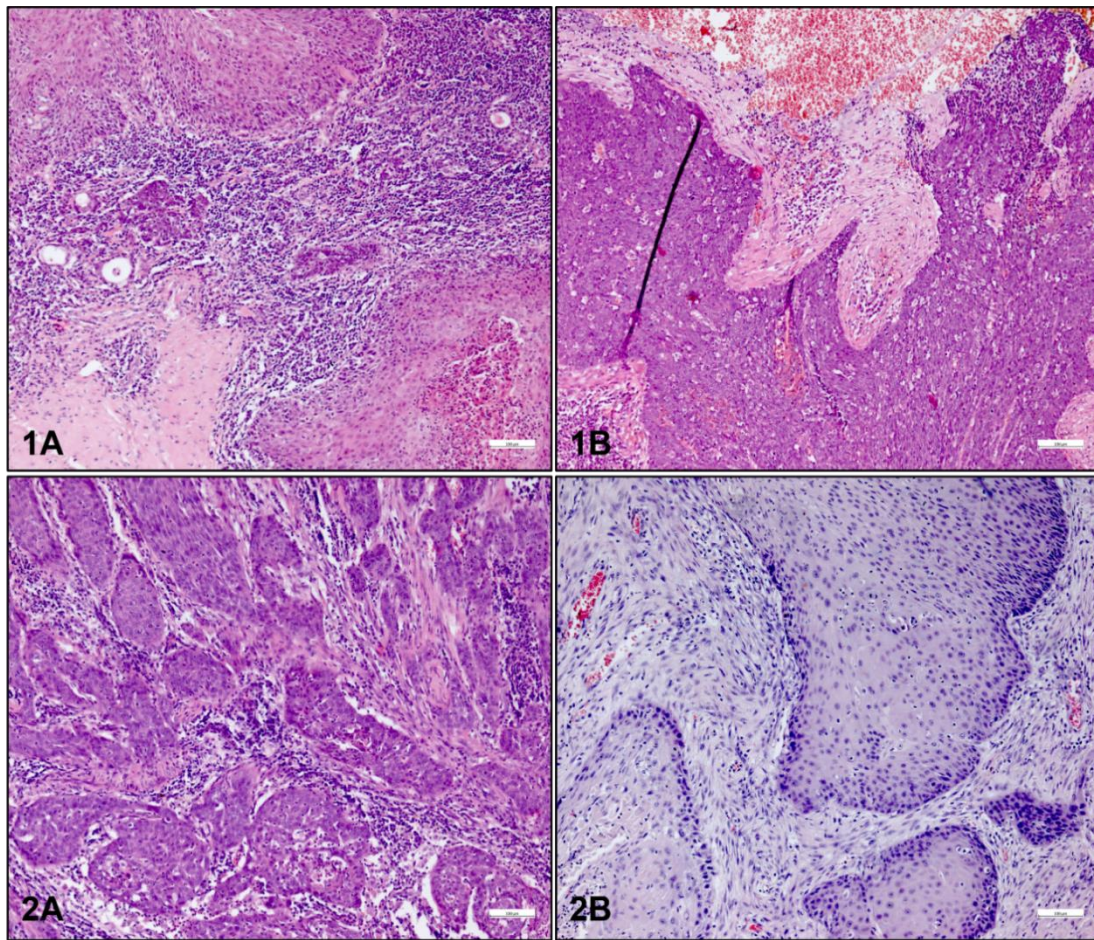


Abbildung 3: Morphologie der Karzinome in Abhängigkeit vom HPV-Status

Die obere Reihe der HE-gefärbten Schnitte (Bild 1A und 1B) zeigt zwei HPV-assoziierte Beispiele: Links (1A) mit vielen TIL (Gruppe 1) und rechts (1B) mit wenigen TIL (Gruppe 0).

Die untere Reihe (Bild 2A und 2B) der Abbildung zeigt zwei HPV-negative Fälle: links (2A) mit vielen TIL (Gruppe 1), rechts (2B) mit wenigen TIL (Gruppe 0).

Abkürzungen: HE, Hämatoxylin-Eosin; HPV, Humanes Papillomvirus; TIL, tumorinfiltrierender Lymphozyten

2.4 Immunhistochemische Auswertung

2.4.1 Allgemeines Vorgehen

Um eine Übersicht über die CMTM6- und PD-L1-gefärbten Gewebeschnitte zu gewinnen, mikroskopierten wir die Präparate zunächst in 40-facher Vergrößerung und fokussierten die Tumor-tragenden Areale. Dabei identifizierten wir in heterogen-gefärbten Tumoren Regionen mit absenter bzw. präsenter Färbereaktion. Für unsere weiteren Analysen (in 200-facher Vergrößerung) wählten wir in inhomogenen reagierenden Fällen positiv dekorierte Tumorabschnitte für das abschließende Scoring. Gemäß diesem Schema selektierten wir in sämtlichen Proben positiv-gefärbte Areale für die Auswertung. Da je Objektträger vollständig erfasste Tumorareale samt Heterogenität dargestellt wurden, minimierten wir das Risiko,

Patienten als falsch-negativ einzugruppieren. Für die Auswertung beider Färbungen waren mindestens 100 erfasste vitale Tumorzellen pro Fall gefordert; Fälle mit weniger als 100 Tumorzellen wurden von der Analyse ausgeschlossen. Pro Fall werteten wir, sofern auf dem entsprechenden Objektträger vorhanden, fünf hochauflösende Gesichtsfelder (HPF) aus. Der daraus gebildete Mittelwert wurde als Score für unsere Berechnungen übernommen.

Zur Bewertung der CMTM6-Expression gibt es mehrere Scoring-Systeme. Dabei wird jeweils der prozentuale bzw. relative Anteile gefärbter Zielzellen in Relation zur Tumorzellpopulation bestimmt.

2.4.2 Kombiniertes Positivitäts-Score

Der kombinierte Positivitäts-Score (CPS) schließt die gefärbten Tumorzellen sowie positiv-gefärbte Immunzellen (Lymphozyten, Makrophagen und dendritische Zellen) ein und setzt sie in Relation zu allen Tumorzellen, (Schildhaus 2018).

$$\text{CPS} = \frac{\text{positive Tumorzellen} + \text{positive Immunzellen}}{\text{Gesamtzahl aller vitalen Tumorzellen}}$$

Für unsere Analysen entschieden wir uns aufgrund der Kollektivgröße und Verteilung des CMTM6-Immunistatus (vgl. diesbezüglich auch die in der Diskussion näher aufgeführten Punkte) für eine binäre Aufteilung. Tumorproben mit einem CMTM6-Score < 10 ordneten wir der „niedrig-positiven“ (low) und Tumorproben mit einem CMTM6-Score ≥ 10 der „hoch-positiven“ (high) Gruppe zu. In Bezug auf PD-L1, einem in der diagnostischen Routine etablierten Biomarker, transportierten wir aktuell gültige Leitlinien in unser Auswerteschema und definierten Fälle mit einem PD-L1 CPS < 1 als „negativ“ und Fälle ≥ 1 als „positiv“.

2.4.3 Tumor Proportion-Score

Der Tumor Proportion-Score (TPS) betrachtet ausschließlich die Tumorzellen, andere Zelltypen werden nicht berücksichtigt. Hinsichtlich der Positivität werden Tumorzellen mit einer membranständigen Färbereaktion jeglicher Intensität gezählt, wobei sowohl eine komplette (zirkuläre) als auch eine inkomplette (partielle) Anfärbung berücksichtigt wurde.

Positive Tumorzellen werden zu den gesamten Tumorzellen in Relation gesetzt, was - anders als beim CPS - die Häufigkeit positiver Tumorzellen in Prozent angibt (Schildhaus 2018).

$$\text{TPS (\%)} = \frac{\text{positive Tumorzellen}}{\text{Gesamtzahl aller vitalen Tumorzellen}} * 100$$

In Anlehnung an die Alltagspraxis der diagnostischen Pathologie, welche den TPS bei zahlreichen Tumorentitäten standardisiert angibt, definierten wir die Cut-offs des TPS in unserem Kollektiv für die CMTM6-Proteinexpression wie folgt:

- keine („non“, < 1 %),
- geringe („low“, 1-50 %)
- hohe („high“, > 50 %)

2.4.4 Inflammatorische Zellen

Das Scoring für die inflammatorischen Zellen (IC) berücksichtigt ausschließlich die positiv-gefärbten Immunzellen (Lymphozyten, Makrophagen und Granulozyten) in Bezug auf die Tumorfläche multipliziert mit 100 in Prozent.

$$\text{IC (\%)} = \frac{\text{gefärbte Immunzellen}}{\text{Tumorfläche}} * 100$$

Auch dieser Score ist in der diagnostischen Routine etabliert und wird in vier Kategorien eingeteilt, welche wir für unsere Auswertungen analog übernahmen:

- IC 0: < 1 % der Tumorfläche sind von positiv-gefärbten Entzündungszellen bedeckt;
- IC 1: ≥ 1 % und < 5 % der Tumorfläche;
- IC 2: ≥ 5 % und < 10 % der Tumorfläche;
- IC 3: ≥ 10 % der Tumorfläche sind von gefärbten Immunzellen bedeckt.

Abbildung 4 veranschaulicht drei repräsentative Beispiele der IHC-Färbung für CMTM6 und PD-L1 in 100-facher Vergrößerung. Sie zeigt beispielhaft das Scoring-System für den CPS und TPS.

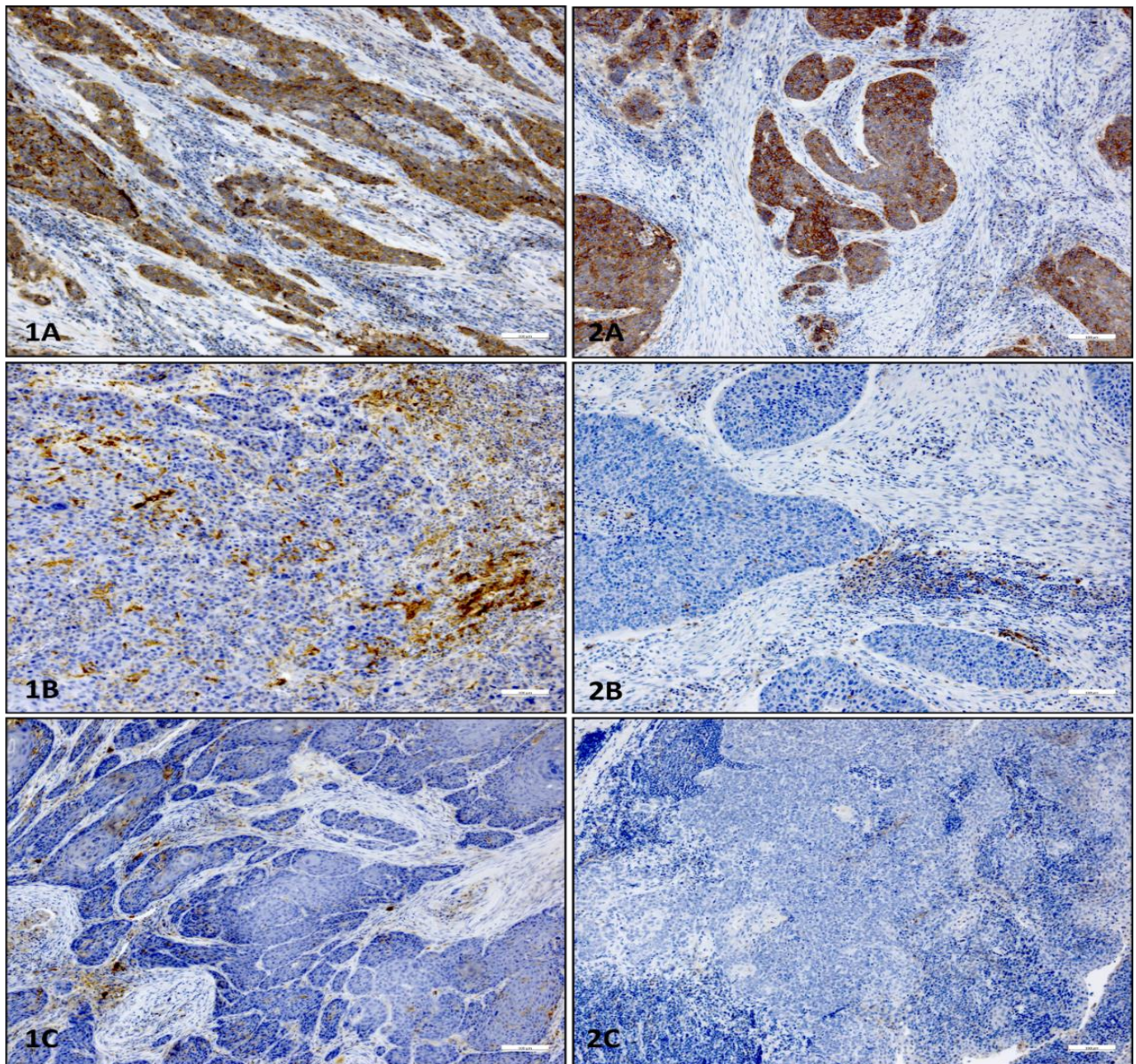


Abbildung 4: IHC-Färbung für CMTM6 und PD-L1 und Illustration des Scoring-Systems für den CPS und TPS

Spalte links (1A-C) zeigt die IHC-Färbungen für CMTM6. In **Bild 1A** reagieren nahezu sämtliche Tumorzellen membranständig positiv; der TPS ist $> 50\%$, der CPS > 50 . In **Bild 1B** reagieren TIL überwiegend positiv, die Tumorzellen bleiben weitestgehend negativ; der TPS ist kleiner $< 1\%$, der CPS ≥ 10 und gemäß unserem Schema somit positiv (trotz weitgehend negativer Tumorzellen). In **Bild 1C** sind Tumorzellen und TIL weitestgehend negativ (einige TIL als interne Positivkontrolle reagieren positiv); der TPS ist $< 1\%$, der CPS < 10 . **Spalte rechts (2A-C)** zeigt analog zur linken Spalte die IHC-Färbungen für PD-L1. **Bild 2A** zeigt einen positiven Fall für den TPS $> 50\%$ und CPS > 50 . **Bild 2B** ist ein Beispiel für einen TPS < 1 und CPS > 1 , da die Tumorzellen nicht auf die IHC-Färbung reagieren, die TIL jedoch schon. In **Bild 2C** sind sowohl Tumorzellen als auch die peritumorale Immunzellen negativ, TPS < 1 , CPS < 1 .

Abkürzungen: IHC, Immunhistochemische Färbung; TPS, Tumor Proportion-Score; CPS, kombinierter Positivitäts-Score; TIL, tumorinfiltrierende Lymphozyten

2.5 Molekulare Analytik p16-positiver Fälle

Zur Sicherung des HPV-Status, führten wir eine molekulare Analytik p16-positiver Fälle durch. Dazu wurde die DNA aus den FFPE-Blöcken entsprechender Plattenepithelkarzinome extrahiert und nach Anleitung mittels des Wizard® DNA Clean-up-System gereinigt. Für die Identifikation der HPV-Typisierung wurde das von Chipron® HPV 3.5 LCD Array Kit (Germany) nach Anleitung angewandt. Patienten, die eine nachgewiesene HPV high-risk-Infektion im Oropharynx hatten, wurden trotz eventueller Noxen-Exposition als HPV-assoziierte Karzinome gewertet.

2.6 Metaanalyse

Um unsere Ergebnisse vergleichen und einordnen zu können, wurde eine Meta-Analyse der Literatur über das Gesamtüberleben sowie die PD-L1- und CMTM6-Proteinverteilung von HPV-positiven und -negativen HNSCCs durchgeführt und die Angaben mit den Ergebnissen der Rostocker Kohorte verglichen.

2.7 Statistische Auswertung

Für die statistische Auswertung wurden die ermittelten Daten aus einer Microsoft® Excel-Tabelle in das Statistikprogramm Prism 8.0.2 (2019) von GraphPad® (Inc. San Diego, Kalifornien, USA) übertragen. Die Kontingenzanalysen wurde mit dem Fisher-exact-Test durchgeführt (Vergleich von CMTM6-Expression (CPS) mit dichotomen Variablen wie Geschlecht, p16-Status, Noxen) sowie dem Chi-square-Test (Assoziation mit >2 Kategorien wie Lokalisation, T-Stadium) und dem Student's t-Test (Vergleich von Mittelwerten). Korrelationen wurden mit dem Spearman-Korrelationskoeffizienten berechnet.

Die Berechnung der Überlebenswahrscheinlichkeiten erfolgte mit der Kaplan-Meier-Methode. Univariate Überlebenszeitanalysen erfolgten mit dem log rank-Testverfahren. Subgruppen-Analysen verglichen das OS hinsichtlich der CMTM6-Expression in Bezug auf Geschlecht, HPV-Assoziation, anatomischer Tumorlokalisierung, Tumorstadium samt Nodalstatus, tumorinfiltrierender Lymphozyten und PD-L1-Expression. Das statistische Signifikanzniveau lag bei einem $p < 0,05$.

3 Ergebnisse

3.1 Gesamtkollektiv Analyse

Initial wurden 391 Patienten aus dem Krebsregister Mecklenburg-Vorpommern ermittelt, welche innerhalb unseres Einschlusszeitraums an einem HNSCC erkrankten. Nach Anwendung unserer Selektionskriterien konnten 95 Patienten in unsere retrospektive Analyse eingeschlossen werden. Hierbei handelte es sich bei 94 Patienten um Primärtumore, in einem Fall lag die Lymphknotenmetastase eines sogenannten „cancer of unknown primary“ (CUP) vor.

Das initiale Einschlusskriterium für unser Ausgangskollektiv war ein fortgeschrittenes Tumorstadium mit der klinischen Notwendigkeit einer systemischen-postoperativen Behandlung in Form einer adjuvanten RCT. Wenngleich wir in Hinblick unserer Fragestellung zu Beginn ausschließlich Patienten mit einer Cisplatin-haltigen RCT einschließen wollten, so weichten wir dieses Kriterium zugunsten der Kollektiverweiterung auf und berücksichtigten auch jene Fälle mit einer ergänzenden oder alleinigen Cetuximab- oder Carboplatin-haltigen Therapie: Eine ergänzende/alleinige Cetuximab Therapie erhielten 8 Patienten. Bei zwei Patienten wurde aufgrund einer bekannten Niereninsuffizienz initial eine Therapie mit Carboplatin begonnen. Bis zum Abschluss des Beobachtungszeitraums erlitten 22 Patienten ein Rezidiv.

3.2 Alters- und Geschlechtsverteilung

Das mittlere Alter der Patienten zum Zeitpunkt der Erstdiagnose lag ebenso wie der Median bei 64 Jahren, die Spannweite reichte von 46 bis 80 Jahre. Bei Diagnosestellung zeigte sich das Alter der Patienten im Shapiro-Wilk Test als normalverteilt. Am Ende des Beobachtungszeitraumes (Juli 2022) waren noch 70 Patienten am Leben, 25 der Patienten waren verstorben. Die 2-Jahres-Überlebensrate lag bei 59 %. Das mediane Überleben lag bei 30 Monaten.

Das Kollektiv setzte sich aus 76 Männern (80 %) und 19 Frauen (20 %) zusammen. Das Geschlechterverhältnis betrug 5:1. Insgesamt erkrankten die Männer im Mittel mit 61 Jahren und somit vier Jahre später als die Frauen mit 57 Jahren.

3.3 Tumorlokalisation und Klassifikation

3.3.1 Tumorlokalisation

In unserem HNSCC-Kollektiv verteilten sich die Tumore wie folgt in die vier definierten Lokalisationen: 26 Tumore fanden sich im Bereich der Mundhöhle (Wangenschleimhaut, harter Gaumen, Zungenkörper sowie Mundboden); 45 Tumore waren im Oropharynx (weicher Gaumen, Tonsillen der Zunge und des Gaumens, Zungengrund sowie Uvula) lokalisiert; 12 Tumore fanden sich im Hypopharynx und 11 im Larynx.

Ein Patient wurde mit der Diagnose eines CUP erstdiagnostiziert. In diesem Fall blieb die Lymphknotenmetastase ohne detektierbaren Primärtumor bestehen. Die Manifestation dieses in Form einer Lymphknotenmetastase manifesten CUP wurde hinsichtlich der Lokalisation des Primärtumors als „unknown-localisation“ angegeben.

Zur schematischen Übersicht fassten wir Mundhöhle und Oropharynx in eine Gruppe und Hypopharynx und Larynx in die andere Gruppe zusammen. Abbildung 5 stellt die absolute Verteilung grafisch dar (rechts im zusammenfassenden binären Schema).

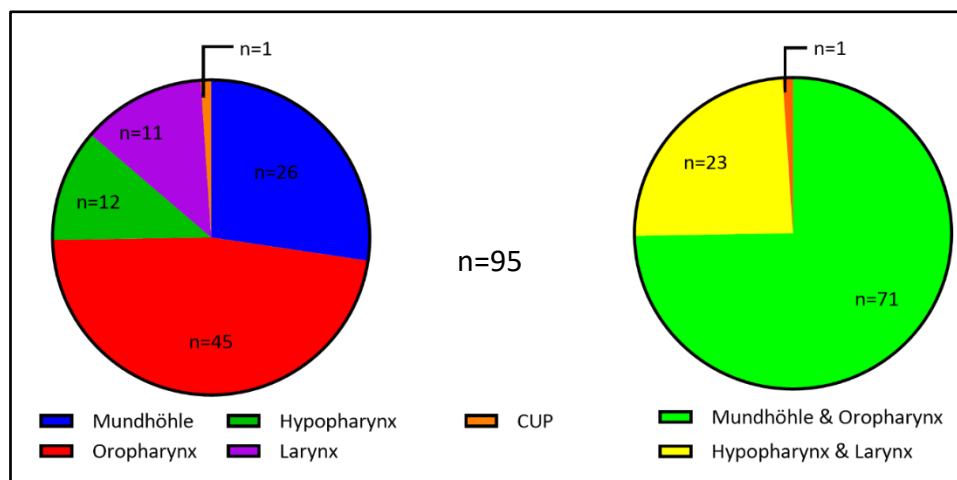


Abbildung 5: Absolute Häufigkeiten der anatomischen Tumorlokalisationen

Unterteilung links nach anatomischen Bezirken der TNM-Klassifikation und rechts nach unserer binären Einteilung.

Abkürzungen: n, Anzahl Patienten; CUP, cancer of unknown primary

3.3.2 Tumorklassifikation und -grad

Tumorstadium: Anhand der Kriterien der seit 2017 gültigen 8. Auflage der TNM-Klassifikation (Wittekind 2020) erfolgte die Tumorklassifikation unseres Kollektivs. Dabei zeigte sich folgende Verteilung hinsichtlich der pathologischen Einteilung des Primärtumors:

Dominierende Gruppe war das pT2-Stadium mit 29 Fällen, gefolgt vom pT4-Stadium mit 24 Fällen, dem pT3-Stadium mit 22 Fällen und dem pT1-Stadium mit 19 Fällen. Im Falle des CUP konnte der T-Status nicht ermittelt werden (siehe Abbildung 6).

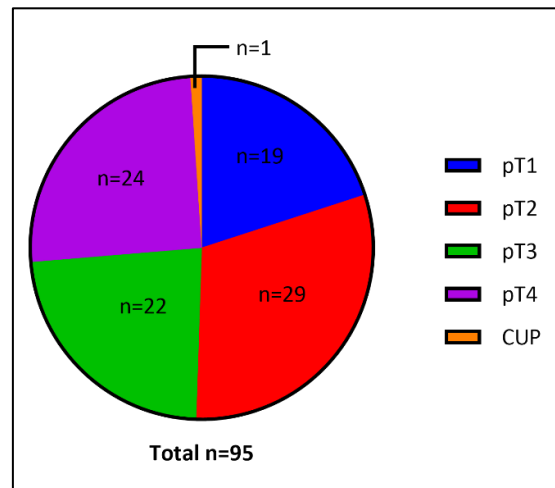


Abbildung 6: Absolute Häufigkeiten der pathologischen Tumorstadien

Abkürzungen: n, Anzahl Patienten; CUP, cancer of unknown primary

Nodalstatus: Wie in der Methodik angegeben, erforderte die von 2017 auf 2018 aktualisierte TNM-Klassifikation eine Re-Klassifizierung von Patienten mit positivem Nodalstatus p16-positiver Tumore unseres Kollektivs, um die klinisch günstige Prognose HPV-assoziiierter Tumore abzubilden. Unter Berücksichtigung der in der 8. Auflage der TNM-Klassifikation aufgeführten Gruppe p16-positiver (HPV-assoziiierter), nicht-kutaner Plattenepithelkarzinome im Kopf-Hals-Bereich aktualisierten wir im Interesse der Harmonisierung unserer Kohorte bei fünf Patienten den Nodalstatus von pN2b auf pN1. Somit wurden diese Patienten, die ein p16-positives Karzinom in der Tonsille mit ipsilateraler Lymphknotenmetastase < 6 cm in größter Ausdehnung erlitten, hinsichtlich ihres Nodalstatus niedriger eingruppiert (Doescher et al. 2017).

Abbildung 7 veranschaulicht die Häufigkeiten und Verteilung der vier Lymphknotenstadien in unserer Kohorte unter der Berücksichtigung der Re-Klassifizierung HPV-assoziiierter Karzinome.

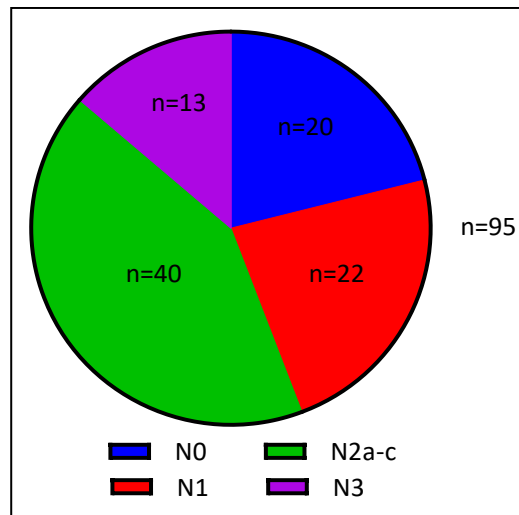


Abbildung 7: Absolute Häufigkeiten des Nodalstatus (nach der 8. Auflage der TNM-Klassifikation)

Abkürzungen: n, Anzahl Patienten; N, Nodalstatus

Metastasen: In 14 Fällen waren zum Zeitpunkt der Erstdiagnose Fernmetastasen (M) vorhanden (Lokalisationen siehe Tabelle 3). Bei den übrigen 81 Patienten bestand eine M0-Situation.

Tabelle 3: Lokalisation der Metastasen zum Zeitpunkt der Erstdiagnose

Lokalisation der Fernmetastasen	Anzahl n
Mediastinum	3
Lunge	9
Pleura	1
Haut	1

Tumorgrad: Gemäß aktueller WHO-Klassifikation entfällt bei HPV-assoziierten Tumoren die konventionelle Tumorgraduierung aufgrund der Diskrepanz zw. morphologisch schlechter Tumordifferenzierung (typischerweise geringer Tumorgrad, G3) und gleichzeitig guter klinischer Prognose. Daher verzichten wir auf die Angabe des Tumorgrads der HPV-assoziierten Tumoren unseres Kollektivs. In Tabelle 4 wird zusammenfassend der Differenzierungsgrad (G) der 60 nicht HPV-assoziierten Karzinome, wovon 16 im Oropharynx und die restlichen 44 in den übrigen Lokalisationen (bei einem Karzinom war im initialen pathologischen Befundbericht kein Tumorgrad angegeben) gezeigt.

Tabelle 4: Differenzierungsgrad der Karzinome

Differenzierungsgrad (G)	Anzahl n
G1	6
G2	41
G3	13
HPV-assoziiert	34
nicht klassifiziert	1

Abkürzungen: G, Differenzierungsgrad (Grading); HPV, Humanes Papillomavirus

3.4 Noxen-assoziierte Karzinome

Sofern aus den klinischen Unterlagen exakt zu eruieren, zeigte sich hinsichtlich der Nikotin- und Alkoholanamnese folgendes Risikoverhalten: 38 Patienten gaben in der Pflegeanamnese an, zu rauchen, 57 waren Nichtraucher. Bezüglich Alkoholkonsum gaben 19 Patienten regelmäßigen Konsum und 76 keinen bzw. unregelmäßigen Konsum an. Schlussendlich wiesen 43 Patienten eine der beiden oder beide Noxen in ihrer Anamnese vor, 52 verneinten eine entsprechende Noxen-Exposition.

3.5 HPV-assoziierte Karzinome und Verteilung der HPV-Typen

Aufgrund gängiger Leitlinien wurde in 72 Fällen im Rahmen der diagnostischen Routine eine Färbung für p16 als Surrogat-Marker einer HPV-Assoziation durchgeführt. In 34 Tumoren zeigte sich ein als positiv zu wertendes Färbeergebnis. Oropharyngeale Karzinome mit Tumorsitz in der Tonsille zeigten mit 24 Fällen die höchste Frequenz HPV-assoziiierter Tumore. Die übrigen p16-positiven Tumore fanden sich entlang der Zunge in der Mundhöhle sowie in zwei Fällen im Hypopharynx (siehe Tabelle 5). Bei den beiden letztgenannten Karzinomen ist vorrangig ein tiefsitzendes Zungengrundkarzinom mit lokal ausgedehnter Primärtumorausdehnung bis in den Hypopharynx anzunehmen.

Tabelle 5: Lokalisation der HPV-assoziierten Fälle

Lokalisation	Anzahl n
Mundhöhle (Mundboden)	1
Mundhöhle (Zungenkörper)	3
Oropharynx (Tonsille)	24
Oropharynx (Zungengrund)	4
Hypopharynx	2

Für die molekulare Subtypisierung stand Tumormaterial von 18 der 34 p16-positiven Fälle zur Verfügung. Hiervon hatten 16 Proben eine ausreichende DNA-Qualität für die molekulare Untersuchung. Die Subtypisierung dieser Fälle zeigte 13-mal eine onkogene Infektion mit dem Hochrisikotyp HPV-16, und in je einen Fall die Subtypen HPV-26, -33 und -35. Tabelle 6 fasst die klinisch-pathologischen Daten unseres Kollektivs zusammen.

Tabelle 6: Klinisch-pathologische Daten des Gesamtkollektivs

Charakteristika	Anzahl der Patienten	(n=95) in %
Alter in Jahren		
Median	64	
Spannbreite	46 – 80	
Geschlecht		
Männlich	76	80
Weiblich	19	20
Alkoholkonsum		
keinen/gelegentlich	19	20
regelmäßig	76	80
Nikotinanamnese		
Raucher	38	40
Nichtraucher	57	60
Lokalisation		
Mundhöhle	26	27
Oropharynx	45	46
Hypopharynx	12	12
Larynx	11	13
unbekannt	1	2
HPV-Status		
p16-positiv	34	36
p16-negativ	61	64
Adjuvante Therapie		
Cisplatin	85	89
Carboplatin	2	2
Cetuximab	8	9
Rezidiv		
ja	22	23
nein	73	77

Abkürzungen: n, Anzahl Patienten; HPV, Humanes Papillomavirus

3.6 CMTM6- und PD-L1-Expression

Es wurde die Protein-Expression von CMTM6 und PD-L1 initial mittels der drei Scores TPS, CPS und IC auf den Tumorzellen bzw. den assoziierten Immunzellen bestimmt.

3.6.1 CMTM6-Expression für den TPS

Gemäß der Definition für die Schwellenwerte des CMTM6 TPS (< 1 % „non“, 1-50 % „low“ und > 50 % „high“ Expression) konnte bei 76 der 93 Tumore eine IHC-Färbung von CMTM6 nachgewiesen werden. Hierbei war CMTM6 bei 19 Fällen stark hoch-reguliert (> 50 % „high“) (siehe Tabelle 7). In zwei Fällen war die Auswertung der CMTM6-Immunhistochemie aufgrund unzureichenden Gehalts vitaler Tumorzellen nicht möglich.

Tabelle 7: CMTM6-Expression für den TPS

CMTM6 Expression im Tumorgewebe	Häufigkeit	Prozent
TPS < 1 %	17	18
TPS 1-50 %	57	61
TPS > 50 %	19	20
N/A	2	1
Gesamt	95	100

Abkürzungen: TPS, Tumor Proportion-Score; N/A, „not applicable“

3.6.2 CMTM6-Expression für den CPS

Ähnlich Ergebnisse liefert der CMTM6 CPS (Cut-off: < 10 „niedrig-positiv“ und \geq 10 „hoch-positiv“): 76 % der Tumorzellen inklusive des peritumoralen Stromas mit den Immunzellen reagierten nach Anwendung eines Cut-offs \geq 10 „hoch-positiv“ auf die Immunfärbung mit CMTM6 (siehe Tabelle 8). Der Median des CPS lag bei 30 und der Mittelwert bei 40,2.

Tabelle 8: CMTM6-Expression für den CPS

CMTM6-Expression im Tumorgewebe und Stroma	Häufigkeit	Prozent
CPS < 10	23	24
CPS \geq 10	72	76
Gesamt	95	100

Abkürzungen: CPS, kombinierter Positivitäts-Score

3.6.3 IC-Score in Abhängigkeit der CMTM6-Expression

Die Auswertung ergab, dass anhand des IC-Scores aufgrund der geringen Positivitätsrate desselbigen weder für CMTM6 noch für PD-L1 sinnhafte bzw. sicher reproduzierbare

Ergebnisse vorlagen. Daher klammerten wir den IC-Score für weitere Analysen aus und verzichteten auf die detaillierte Angabe der Ergebnisse des IC-Scores für CMTM6 und PD-L1.

3.6.4 PD-L1-Expression für den CPS

Aufgrund des klinischen Kontextes und den Vorgaben der Leitlinien haben wir uns bei der PD-L1-Expression ausschließlich auf den CPS konzentriert und den TPS für PD-L1 nicht erhoben. Für die Auswertung der PD-L1-Färbung mittels CPS nutzen wir den im klinisch-diagnostischen Alltag etablierten Schwellenwert „1“ (Cut-off: < 1 „negativ“ und ≥ 1 „positiv“) (Schildhaus 2018). Tabelle 9 zeigt, dass gemäß dieser Definition 66 Karzinome in unserem Kollektiv positiv für PD-L1 waren.

Tabelle 9: PD-L1-Expression für den CPS

PD-L1-Expression im Tumorgewebe und Stroma	Häufigkeit	Prozent
CPS < 1	29	31
CPS ≥ 1	66	69
Gesamt	95	100

Abkürzungen: CPS, kombinierter Positivitäts-Score

Insgesamt stellte sich die Protein-Expression in den Tumoren unseres Kollektivs sowohl für CMTM6 (CPS und TPS) als auch für PD-L1 (CPS) sehr heterogen dar. Dies belegt die Spannbreite (0 bis 100) des CPS beider Proteine.

3.6.5 Assoziation von CMTM6 CPS und PD-L1 CPS

Vergleicht man den CPS von CMTM6 und PD-L1, so lässt sich kein Zusammenhang in der Expression feststellen ($p=0,435$). Von den 23 Fällen, die für den CMTM6 CPS niedrig-positiv waren, hatten fünf Fälle ein negatives Ergebnis der IHC-Färbung von PD-L1 und 18 Fälle waren positiv für PD-L1. Die 72 hoch-positiven Fälle für CMTM6 (CPS >50) waren in 24 Fällen negativ und in 48 Fälle für PD-L1 positiv (vergleiche Tabelle 10).

3.6.6 Tumorinfiltrierende Lymphozyten

Wie in der Methodik (Absatz 2.3.4) dargelegt, erfolgte die Bewertung der TIL nach einem binären Schema. Es wurde folgende Konstellation für unser Kollektiv ermittelt: Für die „low“ Gruppe (< 3) waren 16 Fälle „niedrig-positiv“ und 39 Fälle „hoch-positiv“ für CMTM6. In der „high“ Gruppe (≥ 3) der TIL waren 7 Fälle „niedrig-positiv“ und 31 Fälle „hoch-positiv“ für CMTM6. Bei zwei Fällen konnte der TIL-Status nicht erhoben werden. Wir konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede zw. den Gruppen mittels Vierfelder-Tafel erkennen ($p=0,329$).

3.7 Klinisch-pathologische Parameter in Bezug auf die CMTM6-Expression

Für die statistische Auswertung wurde in Anlehnung an bereits publizierte Daten mit dem CMTM6 CPS (Cut-off: < 10 „niedrig-positiv“, ≥ 10 „hoch-positiv“) gearbeitet. Dabei wurde die Kohorte in zwei Gruppen (low und high) stratifiziert, um eine ausreichende Gruppenstärke für weitere Subgruppenanalysen zu gewährleisten. Hervorzuheben sind die Ergebnisse zum HPV-Status und der Lokalisation die einen signifikanten Unterschied in der CMTM6-Expression zeigen.

Klinisch-pathologische Kerndaten in Abhängigkeit der CMTM6-Expression sind in Tabelle 10 zusammengefasst.

Tabelle 10: Kontingenztafel nach der CMTM6-Expression

Charakteristika	CMTM6 low < 10 (n=23)	%	CMTM6 high ≥ 10 (n=72)	%	Signifikanz p-Wert
Alter in Jahren					
< 65	18	25	53	75	0,786
≥ 65	5	21	19	79	
Geschlecht					
Männlich	21	28	55	72	0,145
Weiblich	2	11	17	89	
HPV-Status					
positiv	4	12	30	88	0,0455
negativ	19	31	42	69	
Noxen-assoziiert					
ja	11	26	32	74	0,813
nein	12	23	34	77	

Charakteristika	CMTM6 low < 10 (n=23)	%	CMTM6 high ≥ 10 (n=72)	%	Signifikanz p-Wert
Lokalisation					
Gruppe1 (Mundhöhle, Oropharynx)	13	19	58	81	0,028
Gruppe2 (Hypopharynx, Larynx)	10	43	14	57	
Tumorstadium					
T1+T2	8	16	41	84	0,093
T3+T4	15	33	31	67	
Tumor-Grading*					
G1+G2	15	31	33	69	0,999
G3	4	31	9	69	
TIL**					
< 3 (low)	16	29	39	71	0,329
≥ 3 (high)	7	18	31	82	
PD-L1-Status					
negativ	5	17	24	83	0,435
positiv	18	27	48	73	
Nodal-Status					
negativ	5	25	15	75	0,9
positiv	18	24	57	76	

Abkürzungen: n, Anzahl Patienten; HPV, Humanes Papillomvirus; T, primär Tumor; G, Grading

(Differenzierungsgrad); TIL, tumorinfiltrierende Lymphozyten; *, p16-positive Karzinome wurden als eigenständige Entität angesehen; **, zwei Fälle konnten nicht erfasst werden; p-Werte wurden mit dem Fisher-exact-Test berechnet

3.8 Korrelationsanalyse

Für die Korrelationsanalyse mit den klinisch-pathologischen Parametern nutzen wir auf Grund der ordinal-skalierten Werte den Rangkorrelations-Koeffizienten nach Spearman (r). Für unsere bivariate Korrelationsanalyse korrelierten wir zuerst den CMTM6 CPS mit dem CMTM6 TPS. Es ergab sich eine hochsignifikante Korrelation ($p=0,001$; $r=0,725$). Wir haben uns aufgrund der Tatsache, dass die Korrelation von CPS und TPS für CMTM6 sehr stark ist und der CPS nicht nur die CMTM6-Expression im Tumorgewebe abbildet, sondern auch die CMTM6-Expression in positiven Immunzellen, für weitere Analysen auf den CMTM6 CPS konzentriert. Die Ergebnisse sind in Tabelle 11 dargestellt.

Tabelle 11: Bivariate Korrelationsanalyse für CMTM6 CPS

Parameter	CMTM6 CPS vs. IC	CMTM6 CPS vs. TIL	CMTM6 CPS vs. Grading	CMTM6 CPS vs. Alter bei ED	CMTM6 CPS vs. T-Status	CMTM6 CPS vs. Nodal- Status
Korrelations- Koeffizient	0,252	0,301	-0,065	-0,0725	-0,257	-0,085
Spearman (r)						
Signifikanz (p)	0,015	0,0035	0,55	0,4875	0,026	0,416

Abkürzungen: CPS, kombinierter Positivitäts-Score; IC, inflammatorische Zellen; TIL, tumorinfiltrierende Lymphozyten; ED, Erstdiagnose

3.9 Überlebensanalysen

Um eine prognostische Vorhersage zu treffen, berechneten wir für unsere Ergebnisse der IHC-Färbungen und den klinisch-pathologischen Daten das Gesamtüberleben (OS) mittels univariabler Analyse und stellten diese mit der Kaplan-Meier-Methode dar. Für die Überlebensanalyse konnten wir aus dem retrospektiven Kollektiv alle 95 Fälle inkludieren. Von den 95 Fällen waren am Ende unserer Analyse noch 70 Patienten am Leben und wurden als zensiert betrachtet. Aufgrund der geringen Anzahl an Ereignissen (25 Tote von insgesamt 95 Patienten) konnte das mediane Gesamtüberleben nicht berechnet werden. Wir definierten das Gesamtüberleben vom Zeitpunkt der Erstdiagnose bis zum Tod bzw. der Zensierung. Für die Überlebensanalyse wurde nicht zw. tumorassoziierter und tumor-unabhängiger Todesursache unterschieden.

3.9.1 Gesamtüberleben

Insgesamt ergab sich eine 1-Jahresüberlebensrate (JÜR) von 82 % und eine 2-JÜR von 59 %. Wenn man nun das Kollektiv nach dem Auftreten von CMTM6 im Tumorgewebe stratifiziert, hatten die Fälle mit CMTM6 CPS ≥ 10 einen hochsignifikanten Überlebensvorteil gegenüber denen mit niedrigen bzw. einen CPS < 10 ($p=0,004$) (siehe Abbildung 8).

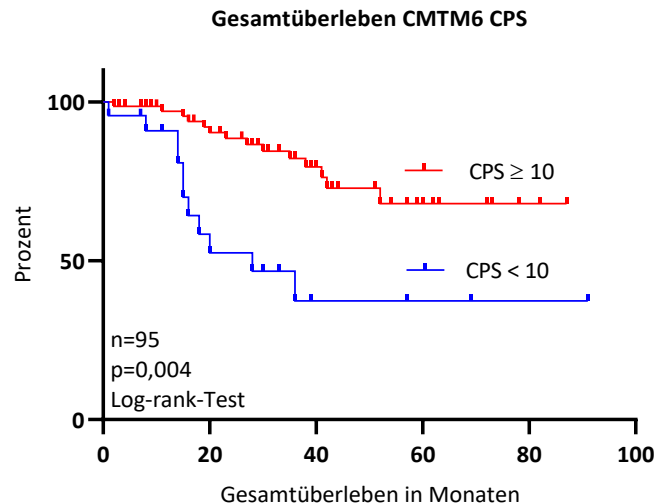


Abbildung 8: Gesamtüberleben des Kollektivs in Abhängigkeit des CMTM6 CPS

Abkürzungen: CPS, kombinierter Positivitäts-Score; n, Anzahl Patienten

Um den prognostischen und prädiktiven Stellenwert von CMTM6, welcher sich auch für alternativ gewählte Schwellenwerte des CMTM6 CPS mit variablen Signifikanzniveaus bestätigte, einordnen zu können, führten wir Überlebensanalysen bestimmter Subgruppen durch. Das Kollektiv teilten wir hierfür in Abhängigkeit vom CMTM6 CPS jeweils konsequent in zwei Gruppen: Tumorfälle mit einem CMTM6 < 10 wurden der „low“, Tumorfälle mit einem CMTM6 ≥ 10 der „high“ Gruppe zugeordnet.

3.9.2 Gesamtüberleben Subgruppenanalysen

Für Subgruppenanalysen des Gesamtüberlebens (OS) in Abhängigkeit des CMTM6 CPS stratifizierten wir unser Kollektiv nach den folgenden Parametern:

- Tumorstadium
- Lokalisation
- HPV-Status
- Noxen-Assoziation
- Nodalstatus
- Tumorinfiltrierender Lymphozyten
- PD-L1-Expression (CPS)

3.9.2.1 Tumorstadium

Betrachtet man das OS in Abhängigkeit der CMTM6-Expression ausschließlich in lokal begrenzten Tumoren (entsprechend pT1/pT2-Stadien) oder exklusiv in fortgeschrittenen Karzinomen (pT3/pT4-Stadium), erkennt man einen signifikanten Überlebensvorteil für die CMTM6 (CPS) hoch-positiven Fälle in beiden Subgruppen, $p=0,0105$ und $p=0,014$ (siehe Abbildung 9).

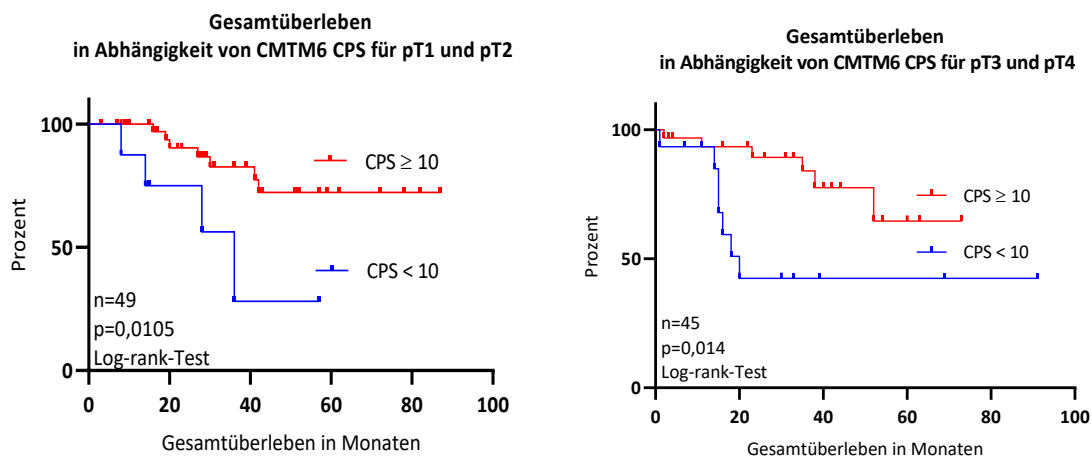


Abbildung 9: Gesamtüberleben der Tumorstadien in Abhängigkeit des CMTM6 CPS

Gesamtüberleben Tumorstadien pT1 und pT2 in Abhängigkeit vom CMTM6 CPS links

Gesamtüberleben Tumorstadien pT3 und pT4 in Abhängigkeit vom CMTM6 CPS rechts

Abkürzungen: CPS, kombinierter Positivitäts-Score; pTx, pathologisches Tumorstadium; n, Anzahl Patienten

Unabhängig von der CMTM6-Expression wurde kein Unterschied zw. den Tumorstadien (pT1–pT4) gefunden ($p=0,496$). Für die Analyse fassten wir die Tumorstadien pT1 und pT2 in eine Gruppe und die Stadien pT3 und pT4 in eine andere Gruppe zusammen (siehe Abbildung 10).

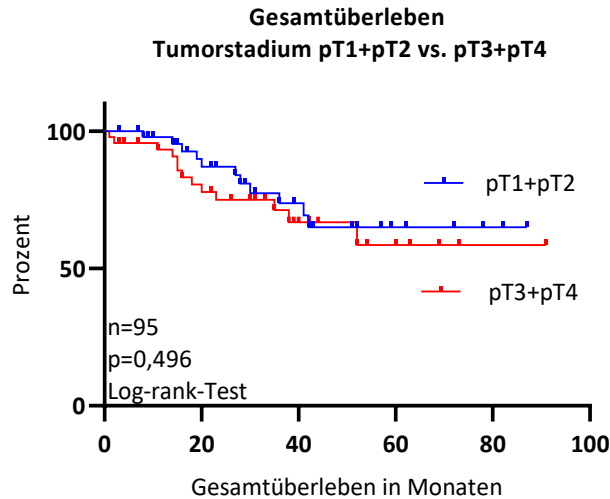


Abbildung 10: Gesamtüberleben der Tumorstadien pT1+pT2 und pT3+pT4

Abkürzungen: pTx, pathologisches Tumorstadium; n, Anzahl Patienten

3.9.2.2 Lokalisationen

Mit Fokus auf sämtliche in der Mundhöhle, der Zunge und dem Oropharynx manifesten Karzinome (n=71) zeigte sich, dass die Gruppe mit besonders vielen CMTM6 hoch-positiven (CPS ≥ 10) Fälle einen hochsignifikanten Überlebensvorteil hatten im Vergleich zu den niedrig-positiven (CPS < 10) Karzinomen ($p=0,0001$), (siehe Abbildung 11).

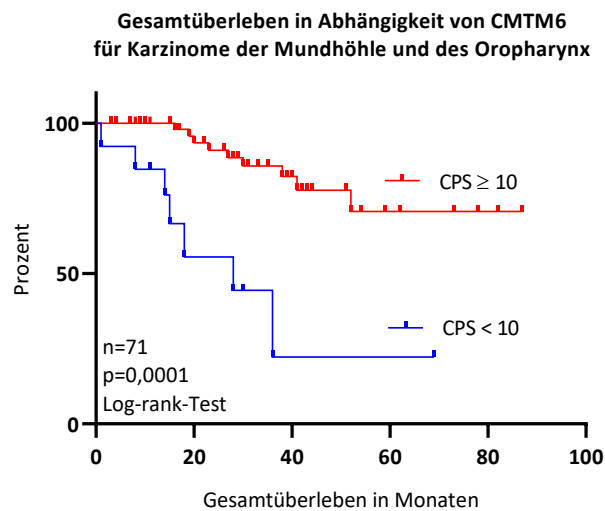


Abbildung 11: Gesamtüberleben für Tumore in Mundhöhle + Oropharynx in Abhängigkeit von CMTM6 CPS

Abkürzungen: CPS, kombinierter Positivitäts-Score; n, Anzahl Patienten

Dem gegenübergestellt konnten wir keinen Unterschied im Gesamtüberleben der Karzinome mit Manifestation im Hypopharynx bzw. Larynx feststellen, wenn wir diese Subgruppe nach CMTM6 CPS stratifizierten ($p=0,583$).

3.9.2.3 HPV-Status

In unserem Kollektiv wiesen HPV-positive Karzinome ($n=34$) mit einem CMTM6 CPS ≥ 10 einen hochsignifikanten Überlebensvorteil im Vergleich zu ihren CPS niedrig-positiven Pendanten auf ($p=0,0002$). Von den 30 Patienten mit hoch-positiver CMTM6-Expression lebten am Ende des Beobachtungszeitraums 100 %, von den vier Patienten mit niedrig-positiven Tumoren 50 %, (siehe Abbildung 12).

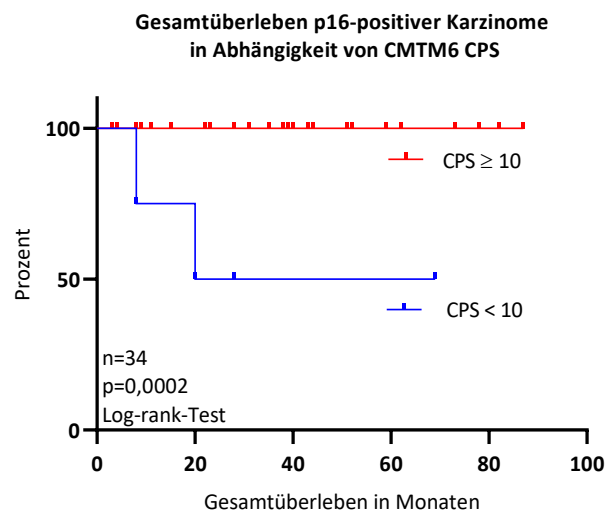


Abbildung 12: Gesamtüberleben HPV-positive Karzinome in Abhängigkeit der CMTM6-Expression

Abkürzungen: HPV, Humanes Papillomvirus; CPS, kombinierter Positivitäts-Score; n, Anzahl Patienten

3.9.2.4 Noxen-Assoziation

Dahingegen haben HPV-negative, also Noxen-assoziierte Karzinome ($n=61$), einen vergleichsweise schwachen signifikanten Vorteil im Überleben, wenn der CPS für CMTM6 hoch-positiv war ($p=0,0434$).

3.9.2.5 Nodalstatus

In Bezug auf den Nodalstatus (nodal-positiv vs. nodal-negativ) der Karzinome in unserem Kollektiv, ergab sich kein Unterschied im Gesamtüberleben in Abhängigkeit der CMTM6-Expression ($p=0,9$).

3.9.2.6 Tumorinfiltrierende Lymphozyten

Um Hinweise auf ein möglicherweise existentes Zusammenspiel zw. CMTM6 und dem Tumormikromilieu (TME) aufzudecken, untersuchten wir den Einfluss der CMTM6-Expression auf das OS in jenen Tumoren mit wenigen bzw. vielen TIL separat.

In der TIL „low“ Gruppe waren 55 Fälle CMTM6 hoch-positiv, sie hatten einen hochsignifikanten OS-Vorteil ($p=0,008$).

In den Tumorfällen mit vielen TIL (high Gruppe) waren 38 Fälle CMTM6 hoch-positiv, sie hatten keinen OS-Vorteil.

3.9.2.7 PD-L1-Expression

In der Annahme, dass CMTM6 PD-L1 stabilisiert und dadurch eine Bedeutung für den klinischen Verlauf PD-L1-positiver Tumore hat, untersuchten wir die Existenz eines CMTM6-assoziierten Überlebensvorteil separat für PD-L1-positive ($CPS \geq 1$) und -negative Tumore. In der PD-L1-positiven Gruppe ($n=66$) waren 73 % CMTM6 hoch-positiv, sie hatten einen statistisch signifikanten OS-Vorteil gegenüber der CMTM6 low Gruppe ($p=0,009$). In den PD-L1-negativen Tumorfällen waren 83 % CMTM6 hoch-positiv und hatten ebenfalls einen signifikanten OS-Vorteil gegenüber der CMTM6 low Gruppe ($p=0,0051$). Die Abbildung 13 veranschaulicht diesen Sachverhalt.

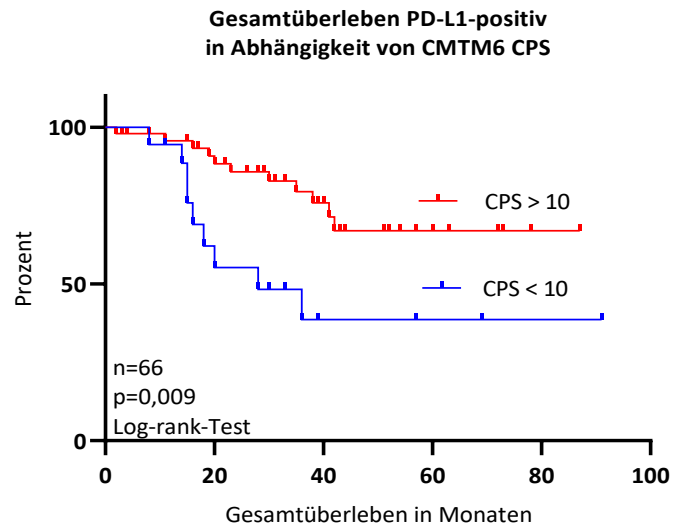


Abbildung 13: Gesamtüberleben PD-L1 positiver Fälle

Abkürzungen: CPS, kombinierter Positivitäts-Score; n, Anzahl Patienten

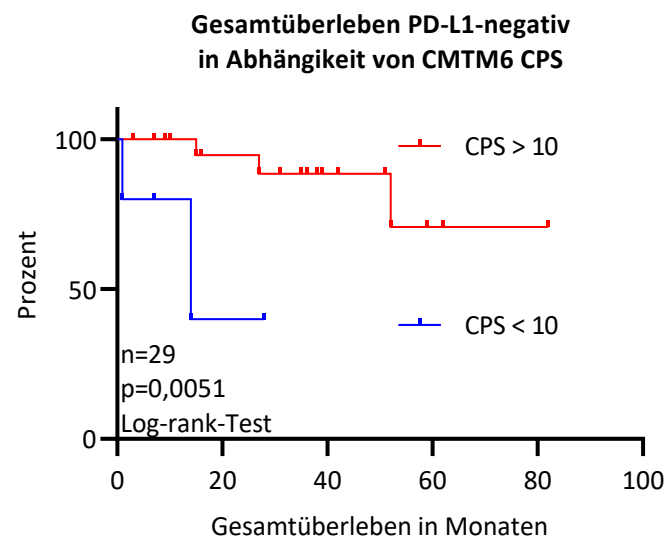


Abbildung 14: Gesamtüberleben PD-L1 negativer Fälle

Abkürzungen: CPS, kombinierter Positivitäts-Score; n, Anzahl Patienten

4 Diskussion

4.1 Die Rolle von CMTM6

Immun-Checkpoint-Inhibitoren spielen seit einiger Zeit eine immer wichtigere Rolle in der Bekämpfung von Karzinomen. Sie werden zunehmend Bestandteil etablierter Therapieschemata. Durch die Zulassung der Food and Drug Administration (FDA) von ICIs im Jahre 2016 zur Therapie von metastasierenden und 2019 für inoperablen Tumoren als Erstlinientherapie im Kopf-Hals-Bereich, bot sich endgültig die Möglichkeit vieler weiterer klinischer Studien, um den Erfolg der ICIs weiter voran zu bringen.

Trotz des Erfolgs der neuen ICIs profitiert derzeit nur eine Subgruppe der HNSCC-Patienten. Aufgrund dessen ist die Etablierung von prädiktiven Biomarkern so entscheidend. Hinweise deuten darauf hin, dass die PD-L1-Expression in HNSCC-Tumoren einen klinischen Nutzen haben. Deshalb wurde 2019 Pembrolizumab (PD-1-Antikörper) zur Erstlinientherapie bei Patienten zugelassen, deren Tumore einen CPS ≥ 1 für PD-L1 exprimieren (Johnson et al. 2020).

Wir befassten uns mit dem Protein CMTM6, welches die Aufrechterhaltung und Stabilität von PD-L1 in der Membran von Tumorzellen unterstützt, in dem es die Ubiquitinierung von PD-L1 unterdrückt und dadurch den lysosomalen Abbau verhindert. Außerdem scheint CMTM6 die Zusammensetzung der Tumormikroumgebung zu beeinflussen, was ebenfalls eine Schlüsselfunktion in der (körpereigenen) Bekämpfung von Malignomen darstellt (Burr et al. 2017).

Laut aktueller Forschung wurde herausgefunden, dass CMTM6 in verschiedenen Tumoren differenzielle Bedeutung für die Prognose hat. Zhu et al. beschreibt, dass eine hohe CMTM6-Expression mit einer besseren Prognose im hepatozellulärem Karzinom assoziiert ist (Zhu et al. 2019). Ebenso wurde dieser Zusammenhang beim Adenokarzinom der Lunge (Wang et al. 2020), tripel-negativen Brustkrebs (Mamessier et al. 2018) und im kolorektalen Karzinom (Peng et al. 2021) festgestellt. Paradoxerweise spricht eine hohe CMTM6-Expression im Adenokarzinom des Pankreas (Mamessier et al. 2018), bei Gliomen (Guan et al. 2018), sowie im HNSCC (Mohapatra et al. 2021; Chen et al. 2020) für eine schlechtere Prognose in der Überlebenschancen.

In dieser wissenschaftlichen Arbeit untersuchten wir mittels IHC-Färbung das Vorliegen von

CMTM6 sowie PD-L1 in nicht-kutanen Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereichs in einem Cisplatin-behandelten Kollektiv und fanden heraus, dass eine hohe Expression von CMTM6 in Tumorzellen sowie im peritumoralen Stroma (assoziierte Immunzellen) mit einer besseren Prognose für das Gesamtüberleben verbunden ist.

Im Gegensatz zu Chen et al. und Mohapatra et al. konnten wir keinen negativen Effekt hoher CMTM6-Expression auf das OS im HNSCC erkennen. Mögl. Gründe wären, dass erstens die Ätiopathogenese eine wichtige Rolle spielen könnte, da im indischen und asiatischen Raum weniger HPV-assoziierte Karzinome vorkommen als im europäischen und amerikanischen Raum. Zweitens: Der chronische Konsum von Kautabak und der Betelnuss haben als Noxen einen deutlich größeren Stellenwert im Vergleich zum kaukasischen Kollektiv. Drittens: Die Auswertschemata der beiden genannten Studien unterscheiden sich im Gegensatz zu den in dieser Studie angewandten Scoring-Systemen (Chen et al. 2020). Für die Ermittlung und Auswertung der Scores (CPS und TPS) für CMTM6 und PD-L1 wurde sich ausschließlich auf Proteinebene mittels IHC-Färbung bewegt und nicht auf mRNA-Ebene. Der simultane Nachweis von mRNA, intrazellulären Proteinen und unseren Oberflächenmarkern wird ein immer größerer Stellenwert beigemessen. Ob sich die komplexen Mechanismen *in vivo* Prozessen auch *in vitro* abbilden lassen wird derzeit noch erforscht. Ausgehend davon, dass die mRNA-Nachweismethoden möglicherweise sensitiver sind, dennoch instabiler, muss man von einer höheren biologischen Wertigkeit vom Protein ausgehen. Deshalb stellt sich die Frage, in welchen Ansätzen sich die Kombination aus der Bestimmung von mRNA- und dem korrespondierenden Oberflächenprotein sinnvoll anwenden lässt und wann die schnell und kostengünstigere IHC-Färbung zum Nachweis genügend Informationsgewinn bietet.

Zusammenfassend gehen wir davon aus, dass die unterschiedlichen Ergebnisse der prognostischen Wertigkeit der Expression von CMTM6 neben eines unterschiedlichen Patientenkollektivs (asiatischer vs. europäischer Raum), auf die verschiedenen angewandten Messmethoden samt Bewertungssysteme (Scoring) zurückzuführen sind.

4.2 Methodendiskussion

Kollektiv-Größe: Die geringe Größe mit insgesamt 95 Fällen unseres Kollektivs ist einer der größten Einschränkungen in unserer Studie. Ein substanzieller Anteil histologischer Präparate bzw. entsprechender tumortragender Gewebeblöcke von initial eingeschlossenen Patienten

war aufgrund einer anderen wissenschaftlichen Studie aus dem Jahr 2018 nicht verfügbar und schwächten somit die Fallzahl unseres Kollektivs. Um diese Kollektivschmälerung abzumildern, entschieden wir uns, das Kollektiv zu erweitern.

Miteingeschlossen wurden zwei Fälle mit First-Line Therapie Carboplatin und 8 Fälle mit First-Line Therapie Cetuximab. Hinzu kommt eine lückenhafte Dokumentation insbesondere von Patienten mit einer Erstdiagnose (ED) vor 2018, welches sich in diesem retrospektiven Design als herausfordernd darstellte und eine unzureichende Erfassung einzelner Parameter (z.B. Noxen-Anamnese) bedingte. Zudem wurden nur Patienten ausgewählt, die ausschließlich an der Universitätsmedizin Rostock behandelt worden sind. Um die Fallzahl zu erhöhen, hätte man von unserer Single-Center-Studie auf ein multizentrisches Design wechseln können.

Immunhistochemische Färbung: In der Routinediagnostik der Histopathologie wird die immunhistochemische Färbemethode eingesetzt. Es handelt sich um ein automatisiertes und standardisiertes Verfahren mit geringer Fehlerquote. Die Färbeautomaten werden regelmäßig gewartet und zu jedem IHC-Färbungslauf werden positive und negative Kontrollen durchgeführt. Die Ergebnisse hängen jedoch von verschiedenen Faktoren ab, wie dem Zustand des Gewebes, dem verwendeten Antikörper und den IHC-Bewertungskriterien (Scoring). Ein Nachteil ist, dass die Antigenität im Gewebe möglicherweise unzureichend erhalten bleibt aufgrund von Paraffineinbettung, Formalinfixation oder nicht fachgerechte oder längerer Lagerung der Paraffin-Gewebeblöcke. Dies kann zu falsch-negativen Ergebnissen führen. Ein weiterer Aspekt ist, dass die Sensitivität der Antikörper für CMTM6 und PD-L1 von verschiedenen Firmen zu unterschiedlichen Ergebnissen führen kann und so die Vergleichbarkeit von Studien erschwert. Die Auswertung und der Vergleich von IHC-Färbeergebnissen anderer Studien sind zudem problematisch, da jeder Pathologe subjektiv beurteilt und unterschiedliche Bewertungskriterien verwendet.

Tumorgehalt und Repräsentativität der Proben: Einige der Präparate enthielten bereits im Vorfeld für Diagnostik und anderen Studien (mehrfach erfolgter) Anschnitte eingeschränkt Tumormaterial. Fälle bei denen die Masse des Tumorgewebes für unsere IHC-Färbung und dem Scoring nicht repräsentativ (kleiner 100 vitale Tumorzellen) waren, wurden ausselektiert. Dies bedingte ebenfalls eine Kohorten-Minimierung. Wie Schildhaus in seiner Arbeit zum „Prädiktiven Wert zur PD-L1-Diagnostik“ beschreibt, könnte das Alter der Proben die Qualität der Protein-Expression von CMTM6 und PD-L1 negativ beeinflussen. Fälle, die vor 2018

immunhistochemisch gefärbt wurden, müssen aufgrund des mögl. Antigenitätsverlustes als kritisch beurteilt werden (Schildhaus 2018). Wie im Methodikteil erwähnt und in vielen Studien zitiert, spielt die Heterogenität der Expression von PD-L1 eine große Rolle (Peng et al. 2021). Dies spiegelt sich ebenfalls in der Expression von CMTM6 wider. Aus diesem Grund haben wir uns für Ganzflächen-Präparateschnitte entschieden, da die repräsentativen Areale inklusive des peritumoralen Stromas umfassender zu analysieren sind als bei der TMA-Methode.

Scoring System: Wir orientierten uns beim Scoring in unserer Studie an den Empfehlungen von Schildhaus (Schildhaus 2018). Jedoch wählten wir für unseren CMTM6 CPS in Anlehnung an die PD-L1-Positivität, einschließlich hier nicht detailliert dargestellter Receiver-Operating-Characteristics-Analyse (ROC-Analyse), einen Cut-off von 10. Der CMTM6 CPS steht derzeit für HNSCC noch nicht im Fokus und hat uns deshalb den Spielraum für den Cut-off von 10 gegeben. Für den CMTM6 TPS wählten wir einen Cut-off von 50 %.

Die in der Literatur unterschiedlich gewählten Cut-offs in den Scorings für den TPS und CPS können die Vergleichbarkeit der einzelnen Studien verzerren. Folgende Kritikpunkte untermauern diese Problematik:

1. Subjektive Bewertung der Gewebeproben: Die Auswertung von Protein-Expression (CMTM6 und PD-L1) basiert auf der Bewertung von Gewebeproben durch den begutachtenden Pathologen. Es gibt jedoch keine klaren, weltweit-standardisierten Kriterien zur Beurteilung der Expression von Oberflächenmarkern, was zu einer gewissen Subjektivität führen kann (Schildhaus 2018).
2. Unterschiedliche Ansichtspunkte für Positivität: Der CPS verwendet einen Cut-off von 1 für die Positivität von PD-L1, was bedeutet, dass eine geringe PD-L1-Expression als positiv gewertet wird (vergl. CMTM6 Cut-off bei 10). Dieser Schwellenwert kann je nach Studie variieren, was zu Inkonsistenzen bei der Interpretation und Vergleichbarkeit der Ergebnisse führen kann (Schildhaus 2018).
3. Relevanz des CPS für die Therapieentscheidung: Es gibt keine eindeutigen Beweise dafür, dass der CPS allein ein zuverlässiger Score für das Ansprechen auf Immuntherapien ist. Es wird argumentiert, dass andere Faktoren wie die

tumorinfiltrierenden Lymphozyten oder das Vorhandensein bestimmter Genmutationen zusätzlich eine bessere Vorhersage der Therapieantwort ermöglichen könnte (Burr et al. 2017).

Es ist wichtig anzumerken, dass diese Kritikpunkte auf die spezifische Anwendung des CPS bei PD-L1-Expression abzielen und nicht notwendigerweise die gesamte PD-L1-Immuntherapie betreffen. Die Bewertung unter anderem von PD-L1 und die Entwicklung der Scoring-Systeme sind ein aktives Forschungsfeld, und es ist notwendig, dass sich in Zukunft neue Ansätze und Standards etablieren.

Als ein weiterer Kritikpunkt ist anzusehen, dass der Score für die TILs in nur einem Kompartiment durchgeführt wurde. Es wurde in dem Zusammenhang nicht zw. der Invasionsfront (peritumorales Stroma) und intratumoral unterschieden. Ferner wurde mit einem vereinfachten binären System (low/high) beim Scoring der TILs gearbeitet. Da nicht immer komplette Resektate zur Verfügung standen, in denen das peritumorale Stroma gut beurteilt werden konnte, sondern auch einige Biopsien mit teilweise absenter Invasionsfront des Tumors.

Lokalisation der Tumore: Eine weitere Schwäche spiegeln die verschiedenen Lokalisationen im HNSCC Kollektiv dar. Es ist bekannt, dass Hypopharynxkarzinome ein schlechteres Überleben aufweisen als Mundhöhlen-, Oropharynx- und Larynxkarzinome. Außerdem spielt die Ätiopathogenese in unserem kaukasischem Kollektiv eine Rolle. Oropharynxkarzinome sind zumeist HPV-assoziiert, wobei Mundhöhlen-, Hypopharynx- und Larynxkarzinome Noxen-assoziiert sind. Demzufolge ist unser binäres System (Zusammenfassen von Mundhöhle + Oropharynx und Hypopharynx + Larynx) als mögliche Schwäche unserer Studie anzusehen.

Wir haben in der Überlebensanalyse nicht zw. Tumor-assoziiertes und Tumor-unabhängiges Todesursache unterschieden, da uns diese Daten nicht vorlagen. Aufgrund dessen können keine Aussagen zu dem Erkrankungs-spezifischen Überleben gemacht werden.

4.3 Ergebnisdiskussion

Um den Erfolg neuer Immuntherapien zu maximieren und ein mögl. insuffizientes Ansprechen auf Chemotherapeutika vorherzusagen, ist es essentiell, weiter an prognostischen und prädiktiven Biomarkern zu forschen. In der vorliegenden Studie konzentrierten wir uns zuerst auf

den Zusammenhang und mögl. Einfluss von CMTM6 auf PD-L1 und weiteren klinisch-pathologischen Parametern, um den prognostischen Effekt von CMTM6 in einem HNSCC-Kollektiv fortgeschrittener Tumorstadien (mit adjuvanter Therapie) heraus zu finden. Erst in einem zweiten Schritt wird die prädiktive Bedeutung von CMTM6 in HNSCC beleuchtet werden.

4.3.1 Klinische Parameter des HNSCC-Kollektiv

Das mediane Erkrankungsalter in unserer Studie von 64 Jahren zeigt sich mit den Daten des Robert Koch-Instituts mit 65 Jahren fast kongruent, so auch das Geschlechterverhältnis von 5:1 (auf Seiten der Männer) und ist somit repräsentativ (Robert Koch-Institut 2019). Es ergab sich sowohl für das Alter bei ED als auch zw. den Geschlechtern in Abhängigkeit der CMTM6-Expression kein Unterschied. In den Studien von Chen et al., Peng et al. und Burr et al. wurde nicht auf den Unterschied der Geschlechter eingegangen, sodass wir dazu keinen Vergleich ziehen konnten (Chen et al. 2020; Peng et al. 2021; Burr et al. 2017). Ungewöhnlich für unser Kollektiv war hingegen, dass Frauen im Mittel vier Jahre früher erkrankten als Männer. Diese Tatsache deckt sich nicht mit den Daten des Robert Koch-Instituts, bei denen die Männer im Mittel zwei Jahre früher erkrankten (Robert Koch-Institut 2019). Eine mögl. Erklärung wären vermehrte Mundhöhlenkarzinome, die früher entdeckt werden, sowie eine vermehrte Nikotin-Exposition, wie sie in Mecklenburg-Vorpommern vorherrscht.

Es zeigte sich keinen Unterschied in der Expression von CMTM6 in Noxen-assoziierten und nicht-Noxen-assoziierten Karzinomen (v.a. HPV-assoziiert). Zu vergleichbaren Ergebnissen kam auch die Arbeitsgruppe um Chen et al., die CMTM6 im HNSCC als negativen prognostischen Biomarker identifizierte (Chen et al. 2020). In der Studie von Peng et al. wurde gezeigt, dass CMTM6 vor allem im Frühstadium exprimiert wurde (Peng et al. 2021). Diesen Zusammenhang konnten wir in unserem HNSCC-Kollektiv nicht beobachten.

Einen signifikanten Unterschied konnten wir im HPV-Status unseres Kollektivs erkennen. HPV-positive Karzinome wiesen eine deutlich höhere CMTM6-Expression auf. Es ist bekannt, dass die HPV-assoziierten Oropharynxkarzinome ein signifikant besseres Überleben haben. Grund dafür ist die hohe Anzahl an TIL und einem aktiveren TME (Perri et al. 2020). Da in unserer Studie CMTM6 (CPS) ebenfalls mit den TIL und einem aktiven TME korreliert, finden sich mit anderen Studien übereinstimmende Ergebnisse (Peng et al. 2021). Bzgl. der Ergebnisse zum

Tumor-Grading und dem Lymphknotenstatus konnten wir im Gegensatz zu Chen et al. keinen Zusammenhang in der CMTM6-Expression ausfindig machen (Chen et al. 2020).

4.3.2 Koexpression von CMTM6 und PD-L1

Ein genaueres Verständnis der molekularen Mechanismen und der Regulation von PD-L1 in Tumorzellen könnten den Erfolg der Therapie mit ICI deutlich verbessern. Burr et al. Hatten gezeigt, dass CMTM6 ein Schlüssel-Protein in der Expression von PD-L1 und somit der Anti-Tumor-Immunität ist. Sie beschreiben, dass CMTM6 nicht an der Reifung von PD-L1 maßgeblich beteiligt ist (Interferon γ als Zytokin spielt eine weitaus wichtigere Rolle), sondern ein zentraler Faktor für die Stabilisierung von PD-L1 an der Plasmamembran von Tumorzellen und für die Verhinderung des lysosomalen Abbaus von PD-L1 ist.

Einen klaren Zusammenhang in der Koexpression von CMTM6 und PD-L1, die Burr et al. sowie Chen et al. in ihren Studien herausgefunden haben, konnten wir in unserer Arbeit nicht bestätigen (Chen et al. 2020). Sowohl 73% der PD-L1-positiven als auch 83% der PD-L1-negativen Tumoren waren für CMTM6 CPS hoch-positiv. Interessanterweise konnten Peng et al. ebenfalls keinen Zusammenhang zw. CMTM6 und PD-L1 in ihrer Studie zum CRC feststellen (Peng et al. 2021).

Wir schlussfolgern daraus, dass zum einen diese widersprüchlichen Ergebnisse in der Koexpression von CMTM6 und PD-L1 an den verschiedenen Methoden zur Bewertung IHC-Färbungen liegen kann, und zum anderen spielt die Heterogenität der Entitäten und innerhalb der Karzinome eine wichtige Rolle. Gleichzeitig ist eine weitere mögliche Ursache für den nicht beobachteten Zusammenhang die geringe Größe unseres Kollektivs sowie möglicherweise unser gewähltes Auswerteschema. Ausblickend sei erwähnt, dass eine zwischenzeitlich erfolgte Vergrößerung des hier untersuchten Kollektivs durch Verlängerung des Einschlusszeitraums bis einschließlich 06/2021 eine statistisch signifikante positive Korrelation der PD-L1 und CMTM6-Expression von 150 HNSCCs zeigt (bislang nicht publizierte Daten der Arbeitsgruppe).

4.3.3 Heterogenität innerhalb der HNSCCC

Die Heterogenität von CMTM6 und PD-L1 bezieht sich auf die Unterschiede in der Expression der beiden Proteine auf verschiedenen Zellen oder Geweben. Die Expression innerhalb eines Tumors stellt sich sehr verschieden dar, was bedeutet, dass einige Tumorzellen hohe Mengen an CMTM6 und PD-L1 exprimieren, während andere keine oder nur geringe Mengen aufweisen.

Die Bedeutung der Heterogenität von potentiellen Biomarkern kann Auswirkungen auf die Wirksamkeit von Immuntherapien haben. Wenn ein Tumor eine hohe Heterogenität von z.B. PD-L1 aufweist, kann dies bedeuten, dass nicht alle Tumorzellen auf die Immuntherapie ansprechen werden. Einige Zellen mit niedriger oder keiner PD-L1-Expression könnten dem Immunangriff entgehen. Daher ist es wichtig, die PD-L1-Expression (und vielleicht auch später die CMTM6-Expression) vor Beginn einer Immuntherapie zu untersuchen, um das potenzielle Ansprechen auf die Behandlung vorherzusagen (Burr et al. 2017).

Auch zu erwähnen ist, dass die Heterogenität von CMTM6 und PD-L1 nicht nur auf Tumorzellen begrenzt ist, sondern auch bei TIL beobachtet werden kann. Diese kann die Interaktion zw. Tumorzellen und den TIL beeinflussen und die komplexe Dynamik des TME verstärken.

Die Expression von CMTM6 kann in Geweben und Zelltypen unterschiedlich sein, vergleicht man dazu die Expression in verschiedenen Tumorentitäten, wie z.B. HNSCC und CRC. Hinzu kommt, dass es auch durch verschiedene Faktoren wie Umweltbedingungen, unterschiedliche Ethnien, Krankheitszustände oder der Ätiopathogenese, wie Noxen oder HPV, beeinflusst werden kann (Johnson et al. 2020), (Peng et al. 2021).

Insgesamt zeigt die Heterogenität von CMTM6 und PD-L1, dass es verschiedene Facetten gibt, die zu Variationen in der Genexpression, Proteinstruktur und Funktion führen können. Die Erforschung des Heterogenitäts-Musters ist wichtig, um ein besseres Verständnis der Rolle von CMTM6 und PD-L1 in der Biologie und in Krankheitsmechanismen zu erlangen.

4.3.4 In welcher Beziehung stehen CMTM6 und HPV?

Das Bewusstsein für den Zusammenhang zw. HPV und Oropharynxkarzinomen hat seit einigen Jahren einen deutlichen Einfluss auf die klinische Praxis. Es wurde gezeigt, dass die HPV-

Impfung wirksam ist, um Infektionen mit den HPV-Typen, insbesondere HPV-16, zu verhindern, die hauptsächlich für HPV-positive HNSCC verantwortlich sind.

Während die Inzidenz von Tabak-assoziierten HNSCC weltweit zurückgeht, nimmt die Zahl der HPV-positiven Fälle zu. Tatsächlich übersteigt die Anzahl der Männer mit HPV-positivem HNSCC mittlerweile die Anzahl der Frauen mit HPV-assoziiertem Gebärmutterhalskrebs in den USA. Dies deutet darauf hin, dass HPV-positive HNSCC ohne eine umfassende HPV-Impfung epidemische Ausmaße annehmen könnte (Johnson et al. 2020).

Im Gegensatz zu Chen et al., welche CMTM6 als negativ prognostischen Biomarker in HNSCC beschreiben (Chen et al. 2020), konnten wir einen statisch hoch-signifikanten Zusammenhang zw. der Expression von CMTM6 und p16, als Surrogat-Marker für HPV-Infektionen, erkennen. P16-positive, also HPV-assoziierte Oropharynxkarzinome, hatten in unserer Studie einen klaren Überlebensvorteil, wenn in den Tumorproben einen CMTM6 CPS ≥ 10 identifiziert wurde.

Es ist zu vermuten, dass CMTM6 einen Einfluss auf die TIL im Bereich des Oropharynx hat. Johnson et al. kristallisierten ebenfalls einen signifikanten Unterschied in Bezug auf die Häufigkeit und Zusammensetzung von Immunzellen zwischen HPV-positiven und HPV-negativen Tumoren heraus (Johnson et al. 2020). HPV-positive Tumoren weisen in der Regel eine höhere Anzahl von TIL auf im Vergleich zu HPV-negativen Tumoren. Es ist wichtig zu beachten, dass Patienten mit HPV-positiven Tumoren, die hohe TIL-Spiegel aufweisen, eine exzellente Prognose haben, während Patienten mit HPV-positiven Tumoren und niedrigen TIL-Spiegeln ähnliche Überlebensraten aufweisen wie Patienten mit HPV-negativem (also Noxen-assoziierten) HNSCC (Johnson et al. 2020).

4.3.5 Der Einfluss von CMTM6 auf die tumorinfiltrierenden Lymphozyten

Das Vorkommen der tumorinfiltrierenden Lymphozyten in der Tumormikroumgebung (TME) ist nicht alleine durch die Expression von CMTM6 und PD-L1 zu erklären, sondern es spielen viele weitere Faktoren eine Rolle. Dennoch fanden Burr et al. heraus, dass CMTM6 ein entscheidender Regulator der T-Lymphozyten vermittelten Antitumor-Immunität darstellt (Burr et al. 2017). Dahingegen berichten Chen et al., dass ein Ausschalten (Depletion) von

CMTM6 im HNSCC den immunsuppressiven Zustand abschwächt und sich dadurch die Anzahl der TIL erhöht (Chen et al. 2020).

In der vorliegenden Studie korrelierte eine erhöhte Expression von CMTM6 mit einer hohen Anzahl an TIL. Untermuert werden diese Ergebnisse von der Arbeitsgruppe um Peng et al. - Sie stellten fest, dass die Expression von CMTM6 im kolorektalen Karzinom (vor allem im Frühstadium T1) hoch reguliert wurde und zu einem vermehrten Aufkommen tumorinfiltrierender Lymphozyten führte, was per se für eine bessere Prognose im OS steht (Peng et al. 2021).

4.3.6 Überlebenszeitanalysen

Die exakte Auswirkung des CMTM6-Signalweges ist bis heute noch nicht endgültig verstanden. Im HNSCC wird angenommen, dass die Überexpression von CMTM6 für eine schlechtere Prognose steht (Chen et al. 2020).

In unserer Studie fanden wir heraus, dass Patienten mit CMTM6 hoch-positiven Tumoren ein signifikant besseres Gesamtüberleben hatten als die Gruppe mit niedrig-positiver CMTM6-Expression (CPS <10).

Als ungewöhnlich anzusehen ist, dass das Tumorstadium (pT1 – pT4) keinen Einfluss auf das OS hatte. Wir sehen die Ursache in der Heterogenität des Kollektivs (Tumorstadien, HPV-assoziierte Karzinome, Lokalisation der Tumore) samt Behandlung (Fälle mit standardisierter RCT, Abbruch nach x-Zyklen aufgrund Komorbiditäten, etc.).

Dennoch wurde festgestellt, dass die Subgruppe der Tumorstadien in dem gewählten binären System (Gruppe 1 = pT1 + pT2 und Gruppe 2 = pT3 + pT4) ein signifikant besseres OS hatten, wenn die Expression von CMTM6 CPS ≥ 10 war.

Betrachtet man die Lokalisationen der Tumore in diesem Kollektiv, so konnten wir für die Mundhöhlen- und Oropharynxkarzinome einen signifikanten Unterschied im OS erkennen, wenn sie CMTM6 hoch-positiv waren. Dahingegen kam es zu keinem Vorteil in Hypopharynx- und Larynxkarzinomen. Das könnte zum einen an den HPV-assoziierten Karzinomen liegen, welche eine bessere Prognose aufweisen, und zum anderen werden Hypopharynxkarzinome später erkannt und haben zumeist eine schlechtere Prognose.

Der Vergleich des Gesamtüberlebens mit anderen Studien gestaltete sich als schwierig, da zum einen die asiatische Bevölkerung weniger an HPV-assoziierten Karzinomen leidet und die Noxen-Assoziation eine andere ist (Kautabak und Betelnuss) (Johnson et al. 2020), sodass wir hier keine eindeutige Aussage zum prognostischen Wert treffen können.

5 Zusammenfassung

Bei nicht zufriedenstellender Prognose von fortgeschrittenen HNSCC-Tumoren besteht Forschungsbedarf, um die Eigenschaften von Tumoren dem Immunsystem zu entfliehen, besser zu verstehen und perspektivisch adäquat zu therapieren. Ein Mechanismus der Immunevasion ist die Expression von Immun-Checkpoint-Molekülen, wie beispielsweise PD-L1. Dieses sorgt auf der Tumorzelloberfläche für eine Blockierung der T-Zell-vermittelten Immunreaktion. Um die Therapien noch zielgerichteter und effektiver zu gestalten, ist es essentiell, die Co-Moleküle von PD-L1 zu erforschen. Wir konzentrierten uns dabei auf CMTM6 als Stabilisator des immunsuppressiven Oberflächenmarkers PD-L1.

Ziel dieser Arbeit war es, mittels Immunhistochemie den Einfluss der CMTM6-Expression auf Tumorzellen und assoziierten Immunzellen in einem Cisplatin-behandelten Kollektiv zu untersuchen und die Ergebnisse mit dem Gesamtüberleben der 95 HNSCC-Patienten in einem 6-Jährigen Erhebungszeitraum zu korrelieren.

Wir sehen, dass der CPS von CMTM6 signifikant frequenter ist in HPV-assoziierten Karzinomen sowie in Mundhöhlen- und Oropharynxkarzinomen. Weitere klinische Parameter (Patientenalter, Geschlecht, Tumorstadien, Grading und Noxen-Assoziation) zeigten keinen Zusammenhang mit der CMTM6-Expression.

Eine hohe CMTM6-Expression korrelierte positiv mit der Anzahl tumorinfiltrierender Lymphozyten, welche in HPV-assoziierten Karzinomen laut Literatur für ein besseres Gesamtüberleben stehen. Wir konnten keinen signifikanten Zusammenhang in der Expression von CMTM6 und PD-L1 nachweisen.

Unsere Arbeit kommt im Gegensatz zur Datenlage in der Literatur zu dem Schluss, dass ein signifikanter Überlebensvorteil entsteht, wenn Kopf-Hals-Tumore eine hohe Expression von CMTM6 aufweisen.

Im nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom gilt CMTM6 als kontroverser prognostischer Marker dennoch als positiver Prädiktor für das Ansprechen auf eine ICI-Therapie (Hou et al. 2020; Zugazagoitia et al. 2019). In dieser Arbeit haben wir CMTM6 im HNSCC untersucht und sehen eine positive prognostische Wertigkeit. Perspektivisch wäre der prädiktive Stellenwert von CMTM6 im HNSCC hinsichtlich der unterschiedlich aktuell gültigen Therapien zu untersuchen.

6 Literaturverzeichnis

Alimena, Stephanie; Davis, Joshua; Fichorova, Raina N.; Feldman, Sarah (2022): The vaginal microbiome: A complex milieu affecting risk of human papillomavirus persistence and cervical cancer. In: *Current Problems in Cancer* 46 (4), S. 100877. DOI: 10.1016 /j.currprobl-cancer.2022.100877.

Boltz, 2021: Retrospektive Analyse der Immunresponse von PD-L1-positiven Platten-epithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches. Online verfügbar unter https://open-science.ub.uni-mainz.de/bitstream/20.500.12030/7127/1/retro-spektive_analyse_der_imm-20220610121848250.pdf. (letzten Abfrage: 25.9.2022)

Boussiotis, Vassiliki A. (2016): Molecular and Biochemical Aspects of the PD-1 Checkpoint Pathway. In: *The New England journal of medicine* 375 (18), S. 1767–1778. DOI: 10.1056 /NEJMra1514296.

Burr, Marian L.; Sparbier, Christina E.; Chan, Yih-Chih; Williamson, James C.; Woods, Katherine; Beavis, Paul A. et al. (2017): CMTM6 maintains the expression of PD-L1 and regulates anti-tumour immunity. In: *Nature* 549 (7670), S. 101–105. DOI: 10.1038/nature23643.

Chen, Lei; Yang, Qi-Chao; Li, Yi-Cun; Yang, Lei-Lei; Liu, Jian-Feng; Li, Hao et al. (2020): Targeting CMTM6 Suppresses Stem Cell-Like Properties and Enhances Antitumor Immunity in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. In: *Cancer immunology research* 8 (2), S. 179–191. DOI: 10.1158/2326-6066.CIR-19-0394.

Cristina, Valerie; Herrera-Gómez, Ruth Gabriela; Szturz, Petr; Espeli, Vittoria; Siano, Marco (2019): Immunotherapies and Future Combination Strategies for Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. In: *International Journal of Molecular Sciences* 20 (21), S. 5399. DOI: 10.3390/ijms20215399.

Doescher, J.; Veit, J. A.; Hoffmann, T. K. (2017): Die 8. Ausgabe der TNM-Klassifikation: Neuerungen für das Fachgebiet Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde, Kopf- und Halschirurgie. In: *HNO* 65 (12), S. 956–961. DOI: 10.1007/s00106-017-0391-3.

Döscher, J.; Busch, C-J; Schuler, P. J.; Laban, S. (2016): Immuntherapie des HNSCC: Quo vadis? In: *HNO* 64 (10), S. 700–707. DOI: 10.1007/s00106-016-0241-8.

Grün, Jens von der; Rödel, Franz; Brandts, Christian; Fokas, Emmanouil; Guckenberger, Matthias; Rödel, Claus; Balcermpas, Panagiotis (2019): Targeted Therapies and Immune-Checkpoint Inhibition in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma: Where Do We Stand Today and Where to Go? In: *Cancers* 11 (4), S. 472. DOI: 10.3390/cancers11040472.

Guan, Xiudong; Zhang, Chuanbao; Zhao, Jingyan; Sun, George; Song, Qingkun; Jia, Wang (2018): CMTM6 overexpression is associated with molecular and clinical characteristics of malignancy and predicts poor prognosis in gliomas. In: *EBioMedicine* 35, S. 233–243. DOI: 10.1016/j.ebiom.2018.08.012.

Hartmann, Stefan; Zwick, Leonie; Scheurer, Mario J. J.; Fuchs, Andreas R.; Brands, Roman C.; Seher, Axel et al. (2018): MAGE-A11 expression contributes to cisplatin resistance in head and neck cancer. In: *Clinical oral investigations* 22 (3), S. 1477–1486. DOI: 10.1007/s00784-017-2242-8.

Hoffmann, T. (2022): Onkologische Therapiekonzepte bei Kopf-Hals-Karzinomen: Die wichtigsten Ergebnisse der großen Krebskongresse ASCO und ESMO 2021. In: *HNO* 70 (4), S. 249–251. DOI: 10.1007/s00106-022-01153-1.

Hou, Xueyan; He, Sisi; Zhang, Daquan; Yang, Chengli; Shi, Yongli; Zhang, Kuanlin (2020): Expression and Clinical Significance of CMTM6 in Non-small Cell Lung Cancer. In: *DNA and cell biology*. DOI: 10.1089/dna.2020.5564.

Huang, Yue; Zhu, Yingqin; Yang, Jieying; Pan, Qiuzhong; Zhao, Jingjing; Song, Mengjia et al. (2022): CMTM6 inhibits tumor growth and reverses chemoresistance by preventing ubiquitination of p21 in hepatocellular carcinoma. In: *Cell Death Dis* 13 (3), S. 251. DOI: 10.1038/s41419-022-04676-1.

Johnson, Daniel E.; Burtneß, Barbara; Leemans, C. René; Lui, Vivian Wai Yan; Bauman, Julie E.; Grandis, Jennifer R. (2020): Head and neck squamous cell carcinoma. In: *Nature reviews. Disease primers* 6 (1), S. 92. DOI: 10.1038/s41572-020-00224-3.

Mamessier, Emilie; Birnbaum, David J.; Finetti, Pascal; Birnbaum, Daniel; Bertucci, François (2018): CMTM6 stabilizes PD-L1 expression and refines its prognostic value in tumors. In: *Annals of Translational Medicine* 6 (3), S. 54. DOI: 10.21037/atm.2017.11.26.

Marur, Shanthi; Forastiere, Arlene A. (2016): Head and Neck Squamous Cell Carcinoma: Update on Epidemiology, Diagnosis, and Treatment. In: *Mayo Clinic Proceedings* 91 (3), S. 386–396. DOI: 10.1016/j.mayocp.2015.12.017.

Michaud, Dominique S.; Langevin, Scott M.; Eliot, Melissa; Nelson, Heather H.; Pawlita, Michael; McClean, Michael D.; Kelsey, Karl T. (2014): High-risk HPV types and head and neck cancer. In: *International Journal of Cancer* 135 (7), S. 1653–1661. DOI: 10.1002/ijc.28811.

Mohapatra, Pallavi; Shriwas, Omprakash; Mohanty, Sibasish; Ghosh, Arup; Smita, Shuchi; Kaushik, Sandeep Rai et al. (2021): CMTM6 drives cisplatin resistance by regulating Wnt signaling through the ENO-1/AKT/GSK3 β axis. In: *JCI insight* 6 (4). DOI: 10.1172/jci.insight.143643.

Pai, Sara I.; Cohen, Ezra E. W.; Lin, Derrick; Fountzilas, George; Kim, Edward S.; Mehlhorn, Holger et al. (2019): SUPREME-HN: a retrospective biomarker study assessing the prognostic value of PD-L1 expression in patients with recurrent and/or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck. In: *J Transl Med* 17 (1), S. 429. DOI: 10.1186/s12967-019-02182-1.

Peng, Qi-Hua; Wang, Chun-Hua; Chen, Hong-Min; Zhang, Rong-Xin; Pan, Zhi-Zhong; Lu, Zhen-Hai et al. (2021): CMTM6 and PD-L1 coexpression is associated with an active immune microenvironment and a favorable prognosis in colorectal cancer. In: *Journal for Immunotherapy of Cancer* 9 (2). DOI: 10.1136/jitc-2020-001638.

Perri, Francesco; Ionna, Franco; Longo, Francesco; Della Vittoria Scarpati, Giuseppina; Angelis, Carmine de; Ottaiano, Alessandro et al. (2020): Immune Response Against Head and Neck Cancer: Biological Mechanisms and Implication on Therapy. In: *Translational Oncology* 13 (2), S. 262–274. DOI: 10.1016/j.tranon.2019.11.008.

Ribbat-Idel, Julika; Perner, Sven; Kuppler, Patrick; Klapper, Luise; Krupar, Rosemarie; Watermann, Christian et al. (2021): Immunologic "Cold" Squamous Cell Carcinomas of the Head and Neck Are Associated With an Unfavorable Prognosis. In: *Front. Med.* 8, S. 622330. DOI: 10.3389/fmed.2021.622330.

Robert Koch-Institut (2019): Krebs in Deutschland für 2017/2018 https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs_in_Deutschland/kid_2021/kid_2021_c00_c14_mundhoehle_rachen.pdf?__blob=publicationFile. (letzten Abfrage: 18.07.2022)

S3-Leitlinie Mundhöhlenkarzinom, 2021: S3-Leitlinie Mundhöhlenkarzinom. Online verfügbar unter: https://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/fileadmin/user_upload/Downloads/Leitlinien/Mundhoehlenkarzinom/Version_3/LL_Mundhoehlenkarzinom_Langversion_3.0.pdf, zuletzt geprüft am 11.11.2022. (letzten Abfrage:18.07.2022)

Schildhaus, H-U (2018): Der prädiktive Wert der PD-L1-Diagnostik. In: *Der Pathologe* 39 (6), S. 498–519. DOI: 10.1007/s00292-018-0507-x.

Sharan, Rajeshwar N.; Mehrotra, Ravi; Choudhury, Yashmin; Asotra, Kamlesh (2012): Association of betel nut with carcinogenesis: revisit with a clinical perspective. In: *PloS one* 7 (8), e42759. DOI: 10.1371/journal.pone.0042759.

Sritippho, Thanun; Pongsiriwet, Surawut; Lertprasertsuke, Nirush; Buddhachat, Kittisak; Sastraruji, Thanapat; Iamaroon, Anak (2016): p16 - a Possible Surrogate Marker for High-Risk Human Papillomaviruses in Oral Cancer? In: *Asian Pacific journal of cancer prevention: APJCP* 17 (8), S. 4049–4057. Online verfügbar unter <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27644660/>.

Sung, Hyuna; Ferlay, Jacques; Siegel, Rebecca L.; Laversanne, Mathieu; Soerjomataram, Isabelle; Jemal, Ahmedin; Bray, Freddie (2021): Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. In: *CA: a cancer journal for clinicians* 71 (3), S. 209–249. DOI: 10.3322/caac.21660.

Wang, Hui; Gao, Jinping; Zhang, Renfeng; Li, Meng; Peng, Zhongmin; Wang, Haiyong (2020): Molecular and immune characteristics for lung adenocarcinoma patients with CMTM6 over-expression. In: *International Immunopharmacology* 83, S. 106478. DOI:10.1016/j.intimp.2020.106478.

Weichert, W.; Ihrler, S.; Boxberg, M.; Agaimy, A.; Mollenhauer, M.; Hartmann, A. (2018): Morphologie des nicht-kutanen Plattenepithelkarzinoms im Kopf-Hals-Bereich. In: *Pathologe* 39 (1), S. 3–10. DOI: 10.1007/s00292-017-0395-5.

Wittekind, Christian (Hg.) (2020): TNM-Klassifikation maligner Tumoren. Korrigierter Nachdruck 2020 mit allen Ergänzungen der UICC aus den Jahren 2017 bis 2019. 8. Auflage.

Yin, Bo; Ding, Jianyi; Hu, Haoran; Yang, Meiqin; Huang, Baoyou; Dong, Wei et al. (2022): Overexpressed CMTM6 Improves Prognosis and Associated With Immune Infiltrates of Ovarian Cancer. In: *Frontiers in Molecular Biosciences* 9, S. 769032. DOI: 10.3389/fmolb.2022.769032.

Zhao, Yanbin; Zhang, Minghui; Pu, Haihong; Guo, Shengyue; Zhang, Shuai; Wang, Yan (2020): Prognostic Implications of Pan-Cancer CMTM6 Expression and Its Relationship with the Immune Microenvironment. In: *Front. Oncol.* 10, S. 585961. DOI: 10.3389/fonc.2020.585961

Zhu, Xiaonian; Qi, Guangzi; Li, Cong; Bei, Chunhua; Tan, Chao; Zhang, Ying et al. (2019): Expression and Clinical Significance of CMTM6 in Hepatocellular Carcinoma. In: *DNA and cell biology* 38 (2), S. 193–197. DOI: 10.1089/dna.2018.4513

Zugazagoitia, Jon; Liu, Yuting; Toki, Maria; McGuire, John; Ahmed, Fahad Shabbir; Henick, Brian S. et al. (2019): Quantitative Assessment of CMTM6 in the Tumor Microenvironment and Association with Response to PD-1 Pathway Blockade in Advanced-Stage Non-Small Cell Lung Cancer. In: *Journal of thoracic oncology: official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer* 14 (12), S. 2084–2096. DOI: 10.1016/j.jtho.2019.09.014.

Danksagung

Nachfolgend möchte ich einer Vielzahl von Personen meinen Dank aussprechen:

Herrn Prof. Dr. med. Andreas Erbersdobler, Institutsdirektor der Pathologie der Universitätsmedizin Rostock für die Möglichkeit zur wissenschaftlichen Forschung am Institut für Pathologie.

Frau PD Dr. med. habil. Annette Zimpfer für die Vergabe dieses spannenden und interessanten Themas sowie immer die Möglichkeit gehabt zu haben, Fragen zu stellen.

Frau Dr. med. Anne-Sophie Becker, Oberärztin am Institut für Pathologie der Universitätsmedizin Rostock. Ganz besonderen Dank für den anregenden Gedankenaustausch und die außerordentliche Betreuung im Rahmen der Durchführung dieser wissenschaftlichen Arbeit – die vielen Stunden und Geduld, die Sie für mich aufgebracht haben.

Weiterhin möchte ich Frau Zettel, Mitarbeiterin des Tumordatenbank-Systems der Universitätsmedizin Rostock, für die Bereitstellung der Krebsregisterdaten danken.

Zu großen Dank verpflichtet bin ich den Patienten, da ohne deren Zustimmung und Bereitstellung Ihrer persönlichen Daten und Gewebeproben diese Arbeit nicht durchführbar gewesen wäre.

Des Weiteren möchte ich mich bei den Mitarbeitern des Instituts für Pathologie der Universitätsmedizin Rostock für die Unterstützung des praktischen Teils herzlichst bedanken.

Nicht zuletzt danke ich meiner Familie und meinen Freunden für die bedingungslose Unterstützung und Motivation, die mir geholfen haben, diese Arbeit während des Studiums zu beenden. Ohne Euch wäre dies nicht möglich gewesen.

Lebenslauf

Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere eidesstattlich durch eigenhändige Unterschrift, dass ich diese wissenschaftliche Arbeit selbstständig und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Stellen, die wörtlich oder sinngemäß aus Veröffentlichungen entnommen sind, habe ich als solche kenntlich gemacht.

Die Arbeit ist noch nicht veröffentlicht und ist in gleicher oder ähnlicher Weise noch nicht als Studienleistung zur Anerkennung oder Bewertung vorgelegt worden. Ich weiß, dass bei Abgabe einer falschen Versicherung die Prüfung als nicht bestanden zu gelten hat.

Rostock,

(Abgabedatum)

(Unterschrift)