

Universität
Rostock



Traditio et Innovatio

Institut für Pathologie
der Universitätsmedizin Rostock
Direktor: Prof. Dr. med. A. Ebersdobler
Arbeit unter Leitung von PD Dr. med. habil. Anette Zimpfer

Prädiktive Relevanz und funktionelle Bedeutung von *CKLF-like MARVEL transmembrane domain containing Protein 6* (CMTM6) im nicht-kutanen Plattenepithelkarzinom des Kopf-Hals-Bereichs

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

vorgelegt von
Cornelius Kluge
Wiesbaden, 01.04.2025
Verteidigung: 29.10.2025

Amtierender Dekan: Prof. Dr. med. Steffen Emmert

1. Gutachter: PD Dr. med. habil. Anette Zimpfer,
Institut für Pathologie, Universitätsmedizin Rostock, Strempelstraße 14, 18057 Rostock
2. Gutachter: Prof. Dr. med. Sarah Minner,
Institut für Pathologie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, Martinistraße 52,
20246 Hamburg
3. Gutachter: Univ. Prof. Dr. med. Robert Mlynski
Klinik und Poliklinik für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde, Universitätsmedizin Rostock,
Doberaner Str. 137, 18057 Rostock

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	II
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	IV
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	VII
TABELLENVERZEICHNIS	VIII
1 EINLEITUNG.....	9
1.1 EINFÜHRUNG	9
1.2 PLATTENEPITHELKARZINOM IM KOPF-HALS BEREICH	11
1.3 EPIDEMIOLOGIE	12
1.4 RISIKOFAKTOREN	13
1.5 PATHOGENESE DES PLATTENEPITHELKARZINOMS	14
1.6 KLASSIFIKATION	17
1.7 THERAPIE	18
1.8 UNTERSUCHTE PROJEKTRELEVANTE MOLEKÜLE UND SIGNALACHSEN DIESER ARBEIT	21
1.8.1 <i>CKLF-like MARVEL transmembrane domain-containing Protein 6</i>	22
1.8.2 <i>Programmed-Death-Ligand-1</i>	24
1.8.3 <i>Proteinkinase B (AKT) Signalweg</i>	24
1.8.4 <i>Tumorsuppressor p53</i>	27
1.8.5 <i>Tumorsuppressor p21</i>	28
1.9 ZIELSETZUNG	29
2 MATERIAL UND METHODEN.....	31
2.1 PATIENTENKOLLEKTIV.....	31
2.2 HERSTELLUNG VON TISSUE-MICRO-ARRAYS	32
2.3 HE-FÄRBUNG	33
2.4 IMMUNHISTOCHEMISCHE FÄRBUNG.....	33
2.5 VERFAHREN DER IMMUNHISTOCHEMISCHEN FÄRBUNG DES TMA	34
2.6 ANTIKÖRPER	35
2.7 LICHTMIKROSKOPISCHE AUSWERTUNG TISSUE-MICRO-ARRAY	35
2.7.1 <i>Kombinierter positiver Score für den Programmed Death Ligand 1 und CKLF-like MARVEL transmembrane domain-containing Protein 6</i>	35
2.7.2 <i>Anfärbbarkeit der Antikörper für die Proteinkinase B, phosphorylierte Proteinkinase B und Tumorsuppressor 53</i>	36
2.7.3 <i>Prozentualer Anteil der gefärbten Zellen im Tumor für die Proteinkinase B, phosphorylierte Proteinkinase B und Tumorsuppressor 21</i>	37
2.7.4 <i>Semi-quantitativer Score für die Proteinkinase B und die phosphorylierte Proteinkinase B</i>	37
2.7.5 <i>Abbildungen der immunhistochemischen Färbungen</i>	38
2.7.6 <i>Statistische Auswertung</i>	45
3 ERGEBNISSE	47
3.1 ANALYSE DES KOLLEKTIVS	47
3.1.1 <i>Alters- und Geschlechtsverteilung</i>	47
3.1.2 <i>Tumorlokalisation</i>	47

3.1.3	<i>Tumorklassifikation</i>	48
3.1.4	<i>Noxen-assoziierte Karzinome</i>	50
3.1.5	<i>HPV-assoziierte Karzinome</i>	52
3.1.6	<i>Therapie</i>	54
3.2	<i>CKLF LIKE MARVEL TRANSMEMBRANE DOMAINE 6 EXPRESSION</i>	56
3.3	<i>PROGRAMMED CELL DEATH LIGAND 1 EXPRESSION</i>	58
3.4	<i>PROTEINKINASE B (AKT)-EXPRESSION</i>	58
3.5	<i>PHOSPHORYLIERTE PROTEINKINASE B (P-AKT)-EXPRESSION</i>	60
3.6	<i>TUMORSUPPRESSOR 21 (P21)-EXPRESSION</i>	61
3.7	<i>ÜBERLEBENSZEITANALYSE</i>	62
3.7.1	<i>Gesamtüberleben und progressionsfreies Überleben</i>	63
3.7.2	<i>Subgruppenanalysen zum Gesamtüberleben und progressionsfreien Überleben</i>	64
4	DISKUSSION	74
4.1	<i>METHODENDISKUSSION</i>	74
4.2	<i>ERGEBNISDISKUSSION</i>	78
	ZUSAMMENFASSUNG	87
	THESEN	88
	LITERATURVERZEICHNIS	90
	DANKSAGUNG	99
	LEBENS LAUF	100
	EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG	101

Abkürzungsverzeichnis

A

AJCC.....*American Joint Committee on Cancer*
AKT.....*Proteinkinase B*

B

BCL-X.....*B-cell lymphoma-extra large*
BIM*BH3-only-protein*

C

CAF.....*cancer associated fibroblast*
CCND1.....*Cyclin D1*
CDKI*cyclin dependent kinase inhibitor*
CDKN2A*cyclin dependent kinase inhibitor 2A*
CIS.....*Carcinoma in situ*
CMTM6.....*CKLF-like MARVEL transmembran domain 6*
CPS.....*Combined Positive Score*
CTLA-4.....*cytotoxic T-lymphocyte-associated-protein-4*
CUP*Cancer of Unknown Primary*

D

DAB.....*3,3'-Diaminobenzidine*
DNA*deoxyribonucleic acid*

E

EGF.....*Epidermal Growth Factor*
EGFR*Epidermal Growth Factor Receptor*
EGFR-Inhibitor*epithelialer Wachstumsfaktor-Rezeptor-Inhibitor*

F

FAS.....*fas death factor*
Fc*crystalline fragment*
FKHR*forkhead in rhabdomyosarcoma*
FOXO1.....*Forkhead box protein O1*

G

G1*Gap 1*
G2*Gap 2*
GLUT1*Glucose-1-Transporter*
GSK-3 β *Glykogensynthase-Kinase-3- β*
Gy*Gray*

H

HE*hämatoxylin-eosin*
HGF*hepatocyte growth factor*
HIF- α 1*hypoxie- induced factor- α 1*
HLA*humanen Leukozyten Antigen*
HNSCC.....*Head and Neck Squamos cell Carcinoma*

I

ICD10 *International Statistical Classification of Disease and Related Health Problems*
ICI.....*Immun-Checkpoint-Inhibitor*
IFN- γ *Interferon- γ*
IHC*Immunhistochemie*
IL-6.....*Interleukin 6*
IRS..... *Immun reactiv Score*

J

JAK*Januskinase*

K

KI künstliche Intelligenz

M

M Metastase
M2 Mitose
MAPK *Mitogen-activated- Protein*
MDM2.....*Mouse double minute 2 homolog*
mTOR..... *mammalian Target of Rapamycin*

N

N Nodalstatus
NF- κ B *nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells*
NSCLC..... nicht-kleinzelliges Bronchialkarziom

O

OS*overall survival*

P

p16..... *cyclin dependend kinase inhibitor 2A*
p21..... *cyklin-dependent kinase 1*
p53..... Tumorsupressor 53
PAH polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffe
pAKT phosphorylierte Proteinkinase B
PCNA..... *Proliferating-Cell-Nuclear-Antigen*
PDGF*plated- derived growth factor*
PDK1 *phosphoinositide-dependent kinase 1*
PD-L1*programmed cell death ligand 1*
PFS.....*progression free survival*
PI3CA *phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha*
PI3k Phosphoinositid-3-Kinasen
PIP2..... Phasphattidylinositol-4,5-bisphosphonate
PIP3..... Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate
PTEN *phosphatase and tensin homolog*

R

R Rezidiv
RB1 Retinoblastom B1

RCT..... Radiochemotherapie
ROC..... *Receiver Operating Characteristic*
RT..... Radiotherapie

S

S Synthese
SAP..... Systemanalyse Programmentwicklung
SPSS *Statistical Package for Social Science*
STAT..... *Signal Transducers and Activators of Transcription*

T

T Tumor
TIL..... tumorinfiltrierenden Lymphozyten
TMA..... *Tissue-Micro-Array*
TME..... *tumor microenvironment*
TNF- α *Tumor Necrosis Factor α*
TNM..... Tumor-Nodes-Metastasen-System
TP53..... *Tumorsuppressorgen 53*
TRAF3..... *tumor- necrosis factor receptor-associated factor 3*

U

UICC..... *Union for International Cancer Control*
UMR..... Universitätsmedizin Rostock

V

VEGF *Vascular Endothelial Growth Factor*

W

Wnt..... *Wingless Int 1*

Abbildungsverzeichnis

<i>ABBILDUNG 1: ANATOMISCHE REGIONEN DES NICHT-KUTANEN PLATTENEPITHELKARZINOMS IM KOPF-HALS BEREICH</i>	11
<i>ABBILDUNG 2: WELTWEITE INZIDENZ DES HNSCC</i>	12
<i>ABBILDUNG 3: THERAPIEALGORITHMUS FÜR DAS REZIDIVIERTE ODER METASTASIERTE HNSCC</i>	21
<i>ABBILDUNG 4: ENTSTEHUNG VON CHEMORESISTENZ DURCH CMTM6</i>	23
<i>ABBILDUNG 5: IMMUNHISTOCHEMISCHE FÄRBUNG MIT DEN PROJEKTRELEVANTEN ANTIKÖRPERN</i>	45
<i>ABBILDUNG 6: HÄUFIGKEITSVERTEILUNG DER TUMORLOKALISATION IM GESAMTKOLLEKTIV</i>	48
<i>ABBILDUNG 7: HÄUFIGKEITSVERTEILUNG DER UICC-STADIEN IM GESAMTKOLLEKTIV</i>	50
<i>ABBILDUNG 8: HÄUFIGKEITSVERTEILUNG DER NOXENANAMNESE</i>	51
<i>ABBILDUNG 9: HÄUFIGKEITSVERTEILUNG IN ABHÄNGIGKEIT DES HPV-STATUS</i>	53
<i>ABBILDUNG 10: HÄUFIGKEITSVERTEILUNG IN ABHÄNGIGKEIT DES HPV-STATUS UND TUMORLOKALISATION IM GESAMTKOLLEKTIV</i>	54
<i>ABBILDUNG 11: HÄUFIGKEITSVERTEILUNG DER ANGEWENDETEN THERAPIEVERFAHREN IM GESAMTKOLLEKTIV</i>	55
<i>ABBILDUNG 12: HÄUFIGKEITSVERTEILUNG VON CMTM6 IN DEN ANATOMISCHEN REGIONEN DES HNSCC</i>	57
<i>ABBILDUNG 13: HÄUFIGKEITSVERTEILUNG DER P21-EXPRESSION BEI EINEM CUT-OFF ≥ 30 % DER POSITIV GEFÄRBTEN ZELLEN</i>	62
<i>ABBILDUNG 14: KAPLAN-MEIER-ÜBERLEBENSKURVE IM GESAMTKOLLEKTIV</i>	64
<i>ABBILDUNG 15: KAPLAN-MEIER-ÜBERLEBENSANALYSE DES GESAMTKOLLEKTIVS IN ABHÄNGIGKEIT DES CMTM6-CPS</i>	65
<i>ABBILDUNG 16: KAPLAN-MEIER-ÜBERLEBENSANALYSE DER CISPLATIN-THERAPIERTEN SUBGRUPPE IN ABHÄNGIGKEIT DES CMTM6-CPS</i>	66
<i>ABBILDUNG 17: KAPLAN-MEIER-ÜBERLEBENSANALYSE IM GESAMTEN KOLLEKTIV IN ABHÄNGIGKEIT VOM PD-L1 STATUS</i>	68
<i>ABBILDUNG 18: KAPLAN-MEIER-ÜBERLEBENSANALYSE DER CISPLATIN-THERAPIERTEN SUBGRUPPE IN ABHÄNGIGKEIT DES PD-L1-CPS</i>	69
<i>ABBILDUNG 19: KAPLAN-MEIER-ÜBERLEBENSANALYSE DES GESAMTKOLLEKTIVS IN ABHÄNGIGKEIT VOM HPV-STATUS</i>	71
<i>ABBILDUNG 20: KAPLAN-MEIER-ÜBERLEBENSANALYSE IN DER SUBGRUPPE MIT POSITIVEM HPV-STATUS IN ABHÄNGIGKEIT DES PD-L1-CPS</i>	72

Tabellenverzeichnis

TABELLE 1: TNM-KLASSIFIKATION FÜR DAS HNSCC.....	18
TABELLE 2: ANTI-TUMOR-MEDIKAMENTE FÜR DAS HNSCC.....	20
TABELLE 3: VERWENDETE ANTIKÖRPER FÜR DIE IMMUNHISTOCHEMISCHE FÄRBUNG DES TMA	35
TABELLE 4: ZUSAMMENFASSUNG DER IMMUNHISTOCHEMISCHEN FÄRBUNGEN UND DER DAZUGEHÖRIGEN SCORES.....	38
TABELLE 5: ZUSAMMENFASSUNG DER KLINISCH-PATHOLOGISCHEN PARAMETER DES GESAMTKOLLEKTIVS BEI ERSTDIAGNOSE	48
TABELLE 6: ZUSAMMENFASSUNG DER KLINISCH-PATHOLOGISCHEN DATEN IM GESAMTKOLLEKTIV	55
TABELLE 7: HÄUFIGKEITSVERTEILUNG DER CMTM6-EXPRESSION	57
TABELLE 8: HÄUFIGKEITSVERTEILUNG DES FÄRBEVERHALTENS FÜR DEN ANTIKÖRPER AKT ..	59
TABELLE 9: HÄUFIGKEITSVERTEILUNG DES PROZENTUALEN ANTEILS DER GEFÄRBTEN ZELLEN FÜR DEN ANTIKÖRPER AKT	59
TABELLE 10: HÄUFIGKEITSVERTEILUNG FÜR DEN SEMI-QUANTITATIVEN PRODUKTSORE (IRS) FÜR DEN ANTIKÖRPER AKT	59
TABELLE 11: HÄUFIGKEITSVERTEILUNG DES FÄRBEVERHALTENS FÜR DEN ANTIKÖRPER PAKT	60
TABELLE 12: HÄUFIGKEITSVERTEILUNG FÜR DEN PROZENTUALEN ANTEIL AN GEFÄRBTEN ZELLEN FÜR DEN ANTIKÖRPER PAKT	60
TABELLE 13: HÄUFIGKEITSVERTEILUNG FÜR DEN SEMI-QUANTITATIVEN PRODUKTSORE FÜR DEN ANTIKÖRPER PAKT	61

1 Einleitung

1.1 Einführung

Steigende Inzidenzen im onkologischen Setting in nahezu jeder medizinischen Fachdisziplin und die immer noch hohe Mortalität mancher Tumorentitäten spiegeln den hohen Bedarf an weiterführender Forschung im Fachbereich der Onkologie wider.

Das nicht-kutane Plattenepithelkarzinom im Hals-Kopf-Bereich (HNSCC) zählt zu den sechst häufigsten Malignomen weltweit. Steigende Inzidenzen im HNSCC lassen sich in der westlichen Welt verzeichnen. Das HNSCC ist durch eine hohe Sterblichkeit gekennzeichnet (Sung et al., 2021). Neue Erkenntnisse über die Tumorbilogie könnten zu einer Verbesserung von Screening, Diagnostik sowie Therapie führen. Aktuelle Therapien sind mit erheblichen unerwünschten Nebenwirkungen behaftet, die die Lebensqualität von Patient:innen deutlich einschränken. Neue Therapiemöglichkeiten könnten dazu beitragen, die Rate der unerwünschten Nebenwirkungen von Tumorchirurgie, Strahlen- und Chemotherapie zu reduzieren und die Mortalität drastisch zu senken (Peng et al., 2021).

In den vergangenen Jahren kam es zu einem Erkenntniszuwachs bezüglich Tumorgenese und der Beeinflussung der Mikroumgebung durch den Tumor. Bereits vielzählige Identifizierung von entarteten oder onkogen veränderten Oberflächenmolekülen und Signalkaskaden führen zu einem besseren Verständnis der Tumorgenese und den daraus resultierenden Behandlungsansätzen. Zu den neueren Ansätzen zählen aktuell die Sequenzierung des Tumorgenoms und die Erweiterung der klassischen Therapieansätze um die Immuntherapie. Für Patient:innen ist diese in weiten Teilen mit weniger Nebenwirkungen behaftet. Je nach Tumorentität kann das Überleben der Patient:innen durch den Einsatz von Immuntherapie verbessert werden (Ghosh et al., 2022).

Häufige Komplikationen in der Behandlung eines HNSCC sind Therapieversagen und Rezidive. Ursächlich dafür können onkogen veränderte Proteine oder nachgeschaltete Signalachsen sein. Diese sichern ein Überleben der Tumorzelle durch veränderte Expressionsmuster von anti-apoptotischen Proteinen, den Eingriff in den Zellzyklus oder die Veränderung von metabolischen Prozessen. Infolgedessen kommt es zu einem geringeren Ansprechen auf Radio-Chemotherapie oder Immun-Checkpoint-Inhibition. Auch ein gänzliches Aufheben der anti-tumoralen Wirkung der eingesetzten Therapeutika wird in der Literatur beschrieben (Mohapatra et al., 2021).

Neben klassischen histomorphologischen Tumorparametern konnten andere gewebebasierte Faktoren als prognostische und/oder prädiktive Marker identifiziert werden. Sie dienen als Entscheidungshilfen in der Therapieauswahl.

Neu etablierte Biomarker, mit hohem prädiktivem und prognostischem Stellenwert, können helfen, das progressionsfreie Intervall, Gesamtüberleben und Therapieansprechen besser vorhersagen zu können. Die aktuelle 5-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit von Patient:innen mit rezidierten oder metastasierten HNSCC liegt bei 50 – 60 % und könnte durch den Einsatz weiterer Marker deutlich angehoben werden (Fasano et al., 2021).

Die in anderen Tumorentitäten deutlich lebenszeitverlängernde Immuntherapie, als neue Option der personalisierten Medizin, erzielte in der Behandlung von Kopf-Hals-Tumor-Patient:innen einen vergleichsweise schwachen Effekt. Der aktuell einzige Biomarker für das Therapieansprechen fortgeschrittener HNSCC Patient:innen auf eine Therapie mit einem Immun-Checkpoint-Inhibitor, ist die Expression des *programmed cell death ligand 1* (PD-L1) (Liu et al., 2022).

Das Ansprechen einer Immuntherapie im HNSCC unter dem Einsatz von PD-L1-Inhibitoren wie Nivolumab und Pembrolizumab liegt aktuell bei weniger als 20 %. Dies könnte durch den Einsatz weiterer Biomarker und somit neuen Therapieoptionen und Therapiestrategien gesteigert werden (Cohen et al., 2019).

Hou *et al.* konnte das Protein *CKLF-like MARVEL transmembran domain 6* (CMTM6) unter anderem im nicht-kleinzelligem Lungenkarzinom als neuen prognostischen Biomarker für das Ansprechen einer Immuntherapie identifizieren (Hou et al., 2020). Über den prädiktiven Wert von CMTM6 konnte bisher keine eindeutige Aussage getroffen werden. CMTM6 nimmt eine bedeutende Rolle in der Beeinflussung des Tumormilieus durch Stabilisierung von PD-L1 sowie Aktivierung von Kinasen und deren nachgeschalteten Signalkaskaden ein (Zhao et al., 2021). Zusätzlich steht CMTM6 im Zusammenhang mit einer möglichen Cisplatin-Resistenz im HNSCC. Dieses Phänomen konnte in Zelllinienmodellen aber nicht *in vivo* gezeigt werden (Mohapatra et al., 2021).

In anderen Tumorentitäten, wie dem kolorektalem oder dem hepatozellulärem Karzinom, konnte bei vermehrter Expression von CMTM6 eine positive Beeinflussung der Tumormikroumgebung (TME) beobachtet werden. Damit verbunden ist ein anti-proliferativer Effekt des Tumors (Peng et al., 2021; Huang et al., 2022). Somit gilt CMTM6 als vielversprechender prädiktiver und prognostischer Marker, um ein zuverlässiges Ansprechen

auf eine Immuntherapie vorherzusagen. Dies könnte das progressionsfreie Überleben und Gesamtüberleben der an HNSCC erkrankten Patient:innen im kaukasischen Kollektiv steigern.

1.2 Plattenepithelkarzinom im Kopf-Hals Bereich

Nicht-kutane Plattenepithelkarzinome stellen im Kopf-Hals-Bereich 90 % der malignen Tumore dar. *Abbildung 1* zeigt die für das HNSCC typischen anatomischen Regionen in der sich tumoröse Neubildungen manifestieren und stellt die auf klinischer Ebene relevanteste Neoplasie in diesem Bereich dar.

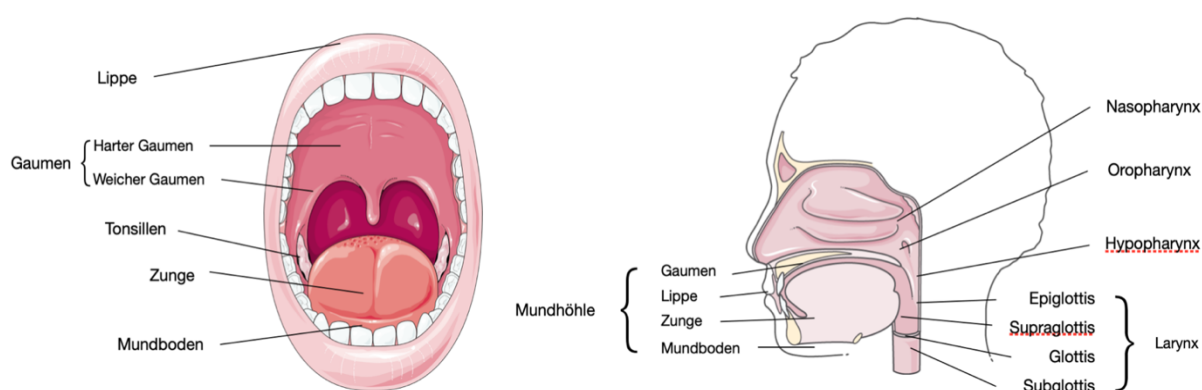


Abbildung 1: Anatomische Regionen des nicht-kutanen Plattenepithelkarzinoms im Kopf-Hals Bereich

Ausgehend von der Mundschleimhaut entsteht das klassische nicht-kutane Plattenepithelkarzinom in den Abschnitten des Larynx (Epiglottis, Supraglottis, Glottis, Subglottis), Mundhöhle (Lippe, Zunge, Mundboden, Gaumen) und Hypopharynx. Virus-assoziierte Karzinome umfassen den Nasopharynx und Oropharynx (Tonsillen). Modifiziert nach (Johnson et al., 2020). Schematische Darstellung entnommen aus www.servier.com.

Plattenepithelkarzinome im Kopf-Hals Bereich lassen sich in Virus- und Noxen-assoziierte Subgruppen einteilen.

Malignome des Oropharynx sind meist mit dem Humanen Papilloma-Virus (HPV), Karzinome des Nasopharynx eher mit dem Epstein-Barr-Virus (EBV) assoziiert. Das klassische nicht-kutane Plattenepithelkarzinom ist auf eine durch Alkohol- und Tabakkonsum hervorgerufene Tumorentstehung zurückzuführen. Es ist lokalisiert im Larynx, der Mundhöhle oder dem Hypopharynx (Weichert et al., 2018).

1.3 Epidemiologie

Bösartige Neubildungen (maligne Tumore) waren im Jahr 2022 nach den kardiovaskulären Erkrankungen die zweithäufigste Todesursache weltweit (WHO, 2022).

Das HNSCC zählt mit 890.000 Neuerkrankungen und 450.000 Todesfällen im Jahr 2022 zu den sechs häufigsten Krebsarten weltweit (Bray et al., 2024). Wie in *Abbildung 2* gezeigt, lässt sich die höchste Inzidenz in Südostasien und Australien aufgrund von erhöhtem Konsum krebsauslösender Substanzen wie Tabak und Alkohol detektieren (Hashibe et al., 2007).

Ein weiterer Anstieg der Inzidenz des HNSCC um circa 30 % wird bis zum Jahr 2050 prognostiziert (Bray et al., 2024).

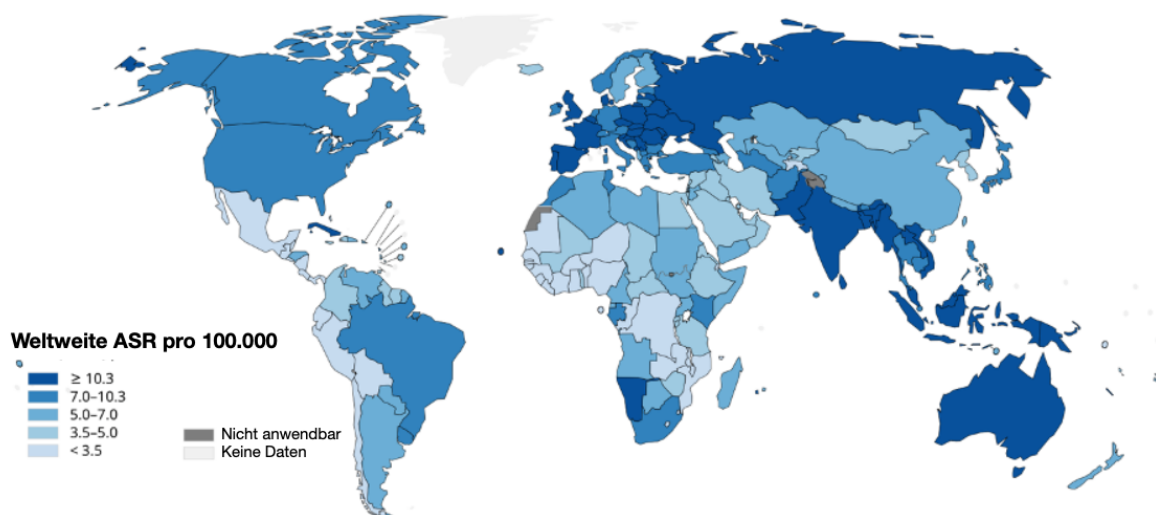


Abbildung 2: Weltweite Inzidenz des HNSCC

Altersstandardisierte Inzidenz pro 100.000 beider Geschlechter von nicht-kutanen Plattenepithelkarzinomen im Kopf-Hals-Bereich. Eingeschlossen wurden die anatomischen Bereiche der Mundhöhle, Nasopharynx, Oropharynx, Hypopharynx und Larynx. Die Daten wurden der GLOBOCAN Global Cancer Statistic 2020 entnommen (Hyuna Sung et al., 2021). Die Landkarte wurde mithilfe des GLOBOCAN *website mapping tools* erstellt und modifiziert.

Abkürzung: ASR: Age-Standardized- Rate

Männer sind von dieser Tumorentität etwa doppelt bis vierfach so häufig betroffen wie Frauen. Das Alter bei primärer Diagnosestellung liegt im Mittel bei 55 Jahren (Johnson et al., 2020).

2020 betrug in Deutschland die Inzidenz von Krebserkrankungen über 490.000 Fällen pro Jahr, bei einer Mortalität von circa 230.000 Fällen pro Jahr (RKI, 2021).

Laut Krebsbericht des Robert-Koch-Instituts (RKI) aus dem Jahre 2018 liegt die Inzidenz in Deutschland für das HNSCC bei circa 21,1 pro 100.000 Personen. Auch in Deutschland erkranken mehr Männer als Frauen. Ein Anstieg der Neuerkrankungsrate ist besonders bei den Frauen zu erkennen. Die Gesamtmortalität liegt bei circa 5.500 Fällen pro Jahr. Das mittlere Erkrankungsalter in Deutschland ist auf 65 Jahre (Männer 63 Jahre; Frauen 66 Jahre) angestiegen. Die 5-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit bei leitliniengerechter Therapie beträgt je nach UICC-Stadium zwischen 83,5 % (Stadium UICC I) und 41,5 % (Stadium IV UICC). Die Vielzahl der neu diagnostizierten HNSCC (Männern 60 %; Frauen: 52 %) werden aufgrund des langen klinisch unauffälligen Verlaufs erst in fortgeschrittenen und teilweise metastasierten Stadien (UICC-Stadium III und IV) diagnostiziert. Daraus resultiert die geringe 5-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit in den UICC-Stadien III und IV (Männer: Stadium III: 59 %, Stadium IV: 50 %; Frauen: Stadium III: 65 %, Stadium IV: 43 %) (RKI, 2017).

1.4 Risikofaktoren

Die drei Hauptrisikofaktoren für die Entstehung eines HNSCC sind Alkohol- und Nikotinkonsum, Viren aus der Gruppe der Humanen Papillomaviren und das Epstein-Barr-Virus. Dabei lassen sich für die Risikofaktoren Alkohol und Tabak, und deren Konsum, kulturelle und geographische Unterschiede erkennen. Nachweislich begünstigt der exzessive Konsum beider Noxen die Entstehung eines HNSCC und erhöht das Risiko an einem HNSCC zu erkranken um das 35-Fache (Johnson et al., 2020).

Das Risiko an einem HNSCC zu erkranken ist bei Patient:innen mit einer positiven HPV-Anamnese für einen high-risk-HPV-Typen im Vergleich zu HPV-negativen Patient:innen um das Vierfache erhöht (Dayyani et al., 2010).

HPV-16 ist der am häufigste bei HPV-positiven HNSCC vorkommende Subtyp, wobei in kleineren Patientengruppen auch die Typen HPV-18, HPV-31, HPV-33 und HPV-52 nachgewiesen werden konnten. Sie alle zählen in die Gruppe der HPV-*high-risk*-Typen, welche nicht-kutane Plattenepithelkarzinome, vorrangig im Bereich des Oropharynx, induzieren können (Michaud et al., 2014).

Weltweit steigende Inzidenzen lassen sich bei oropharygealen HPV-positiven Karzinomen detektieren. Regional unterschiedliche Verteilungen sind dabei zu erkennen. Eine erhöhte und

stetig steigende Inzidenz ist in Ländern mit niedriger Impftrate gegen das Humane Papillomavirus zu verzeichnen (Johnson et al., 2020).

1.5 Pathogenese des Plattenepithelkarzinoms

Die Entstehung eines Plattenepithelkarzinoms erfolgt in mehreren aufeinanderfolgenden Schritten. Das Durchlaufen der einzelnen Schritte zählt in der Mundhöhle als pathognomonisch. In Hypopharynx, Nasopharynx und Larynx werden die einzelnen Schritte nicht klassisch durchlaufen, sodass die einzelnen Vorläuferläsionen nicht immer erkennbar und diagnostizierbar sind. Der Oropharynx nimmt in der Pathogenese aufgrund seines lymphoepithelialen Gewebes und der virusassoziierten Genese eine besondere Stellung ein (Weichert et al., 2018).

In der Mundhöhle kommt es, ausgehend von intakten Epithelzellen der Mundschleimhaut, zunächst zu einer Hyperplasie. Folgend auf die Hyperplasie entstehen Dysplasien, welche wiederum als leichte, mittlere oder schwere Dysplasien kategorisiert werden können. Entartungen einer Dysplasie führen zu einem Karzinom *in situ* (CIS) und letztendlich zu einem invasiven Karzinom. Definitionsgemäß weist das HPV-positive Karzinom, aufgrund seiner Entstehung in lymphoepithelialen Organen, keine echten Vorläuferläsionen oder ein CIS auf. Es ist somit bei Manifestation als invasiv zu betrachten (Johnson et al., 2020).

Ursache für diese Kaskade ist der Funktionsverlust von verschiedenen Zellzyklus regulierenden Proteinen wie der *cyclin dependent kinase inhibitor 2A* (CDKN2A), dem *Tumorsuppressorgen 53* (TP53), der *phosphatase and tensin homolog* (PTEN) oder der Amplifikationen von Cyclin D1 (*CCND1*) (ebd.).

Vorläuferläsionen, gekennzeichnet durch weißliche Schleimhautläsionen, können bereits histomorphologische Anhaltspunkte für eine potenzielle Malignität darstellen. Sie sind daher grundsätzlich weiter abzuklären. So weisen Leukoplakien, als Vorstufe, ein erhöhtes Risiko für Dysplasien oder ein manifestes Plattenepithelkarzinom auf. Dysplasien zeichnen sich durch eine irreguläre Stratifizierung, Verlust der basalen Zellpolarität, gestörte mitotische Aktivität, Verhornungsstörung, Zell- und Kernpleomorphie sowie eine nukleäre Hyperchromasie aus. Erythroplakien des oberen Aerodigestivtraktes hingegen sollten bereits in der Diagnostik als echte neoplastische Vorläuferläsion bewertet werden (Weichert et al., 2018).

Bei der Genese des Plattenepithelkarzinoms muss zwischen den auslösenden Identitäten unterschieden werden. Es liegen verschiedene Mechanismen vor, die schlussendlich zur Entstehung entarteter, tumoröser Zellen führen. Übermäßiger Konsum von Tabak und Alkohol führt zur Induktion von HPV-negativen Plattenepithelkarzinomen. Mehr als 5.000 verschiedene chemische Substanzen sind bereits identifiziert, die potentiell krebsauslösend wirken. Die Hauptvertreter beim Konsum von Tabak sind die beim Verbrennen entstehenden polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffe (PAH) wie Formaldehyd, Benzol und Nitrosamine. PAHs oder deren Metabolite führen zu einer gesteigerten metabolischen Aktivität verschiedener Signalkaskaden. Ebenso können sie DNA-Schäden wie Mutationen und Deletionen hervorrufen. Kovalente Bindungen der Addukte von PAHs an die DNA führen zu strukturellen Veränderungen. Bei einem insuffizienten zellulären Reparaturmechanismus tragen diese durch die PAHs induzierten Abweichungen zur Kanzerogenese bei (Hecht, 1999). Die im HPV-negativen HNSCC am häufigsten auftretenden Genaberrationen betreffen die Inaktivierung der Gene *CDKN2A*, *TP53* und *PTEN*, sowie die erhöhte Amplifikation des Gens *CCND1* (The Cancer Genome Atlas Network, 2015).

Beim Abbau von Alkohol entsteht Acetaldehyd, ein weiteres tumorinduzierendes Molekül. Neben der Fähigkeit mit der DNA zu interagieren unterstützt Acetaldehyd die Aufnahme der PAHs in die Epithelzellen. Durch das Akkumulieren beider Produkte wird die Tumorentstehung begünstigt. Die Einwirkung der Noxen führt zu einer dauerhaften Entzündungsreaktion. Dies führt zu einer vermehrten Produktion von Chemokinen, Cytokinen und Wachstumsfaktoren. Vermehrtes Zellwachstum und gesteigerte Angiogenese führen schlussendlich zur Karzinogenese (Brooks & Theruvathu, 2005).

Im Falle von HPV-positiven Plattenepithelkarzinomen lässt sich ein abweichender Pathomechanismus erkennen. Die Manifestation von HPV-positiven Neoplasien ist im Oropharynx lokalisiert. Der Oropharynx ist geprägt von lymphoepitheliale Gewebe (Waldeyer Rachenring). Das lymphoepitheliale Gewebe weist eine plattenepithelialisierte Oberfläche mit physiologischen Lücken auf. Die präformierten Öffnungen der Basalmembran ermöglichen die Leukopedese von subepitheliale lymphatischen Gewebe nach luminal, aber auch das Eindringen von onkogen transformierenden Infektionen von luminal nach basal. Durch komplexe Mechanismen führt das Virusgenom bei einer onkogen transformierenden HPV-Infektion mit einem der HPV-*high-risk*-Typen (16, 18, 31, 33, 52) zu einem Funktionsverlust des Tumorsuppressors p53 (Bouzid et al., 2023). Eine vermehrte Bindung viraler Onkoproteine an

die im Zellzyklus regulatorisch wirkenden Proteine Retinoblastom 1 (RB1) und p16 (*CDKN2A*) führen ebenfalls zu einer gestörten Zellzyklusregulation. Diese drei Tumorsuppressoren nehmen eine zentrale Rolle in der Regulation des Zellzyklus ein. Eine Hemmung dieser Proteine führt zu ungehindertem Zellwachstum. In HPV-positiven HNSCC kommt es somit primär zu einem Funktionsverlust der Tumorsuppressoren p53, RB1 und p16 (ebd.).

Das Verständnis über die Veränderung verschiedener Genabschnitte von Epithelzellen, hervorgerufen durch Noxen oder Virusinfektionen, erlaubt die Erklärung der Transformation von normalem Gewebe zu einem invasiven Karzinom. Aufgrund einer hohen genetischen Instabilität von tumorös entarteten Plattenepithelzellen, in Form von Genschädigung oder Verlust chromosomaler Abschnitte, kommt es zu den unterschiedlichen Genveränderungen in den einzelnen Stadien der Tumorentwicklung (Johnson et al., 2020).

Neben der gestörten Zellzyklusregulation kommt es zur vermehrten Expression von Signalmolekülen, Rezeptoren oder Rezeptor-Tyrosin-Kinasen. Damit verbunden ist eine erhöhte Aktivität verschiedener nachgeschalteter Signalwege. Dies führt ebenfalls zu einem ungehinderten Zellwachstum. Je nachdem welcher Bestandteil positiv mutiert ist, resultieren verschiedene Prognosen und Therapieansätze für das HNSCC (ebd.).

Die Tumormikroumgebung (TME) spielt in der Tumorgenese eine entscheidende Rolle und führt zu einer Vermehrung und verbessertem Überleben von Tumorzellen. Das TME ist geprägt von peritumoralen Immunzellen, Endothelzellen und tumorzell-assoziierten Fibroblasten (CAF). Durch die Produktion von Wachstumsfaktoren wie dem *epidermal growth factor* (EGF), dem *vascular endothelial growth factor* (VEGF) und dem *hepatocyte growth factor* (HGF) kommt es zur Neovaskularisierung. Sie sorgt für eine Verbesserung der Sauerstoff- und Nährstoffversorgung, was sich begünstigend auf das Zellwachstum auswirkt. Neben den Wachstumsfaktoren haben Chemokine und Cytokine, im besonderen Interleukin-6 (IL-6), einen proliferationsfördernden Effekt auf die Zellen (Zhang et al., 2022).

Gegenspieler zu den proliferativen Aspekten des TME sind die tumorinfiltrierenden Lymphozyten (TIL). Das Immunsystem ist in der Lage, Eiweißstrukturen auf der Tumorzelloberfläche, auch Tumorantigene genannt, als fremd zu erkennen. Nach Präsentation dieser Tumorantigene kommt es zur Vermehrung von T-Lymphozyten, welche in die Tumorregion einwandern. Mit der Bindung zwischen T-Zellrezeptor und Antigen werden die zytotoxischen T-Zellen aktiviert. Sie sind in der Lage, durch die Freisetzung des Proteins Perforin und Einschleusung von Granzymen, die Tumorzellen zu zerstören (Zander et al., 2020).

Einhergehend mit einer vermehrten Anzahl von Lymphozyten weisen HPV-positive HNSCC in der Regel ein stärker ausgeprägtes TME auf. Somit ist eine verbesserte anti-tumorale Abwehr gewährleistet, wodurch HPV-positive HNSCC eine bessere Prognose aufweisen (Johnson et al., 2020).

Um der körpereigenen Immunabwehr zu entkommen, kommt es zur Veränderung im humanen Leukozyten Antigen (HLA) der Tumorzellen. Die Tumorzellen werden nicht mehr erkannt und können nicht mehr zerstört werden. Zudem wird die Expression von PD-L1 und dem *cytotoxic T-lymphocyte-associated-protein-4* (CTLA-4) induziert, welches die Aktivität von zytotoxischen T-Zellen hemmt. Dies verhindert ebenfalls die Tumorzelllyse. Im Falle von HPV-positiven HNSCC kommt es durch virusspezifische Proteine zur veränderten Gen- und Proteinexpression. Wahrscheinlich ist in diesem Fall der Funktionsverlust des *tumor- necrosis factor receptor-associated factor 3* (TRAF3), welcher normalerweise ein anti-virales Protein kodiert, für die Immunevasion von HPV-positiven HNSCC verantwortlich (ebd).

Aufgrund unterschiedlicher Karzinogenese und dem daraus resultierendem TME präsentiert sich das nicht-kutane Plattenepithel des Kopf-Hals-Bereiches histologisch als eine heterogene Tumorentität. HPV-positive Karzinome präsentieren sich eher als basaloide Plattenepithelkarzinome ohne Verhornung, mit einer hohen Anzahl an TIL. HPV-negative Karzinome weisen hingegen atypische Plattenepithelien, eingebettet in desmoplastisches Stroma, mit Verhornung innerhalb der Tumornester und einer geringen Anzahl an TIL auf (Starska-Kowarska, 2023; Weichert et al., 2018).

1.6 Klassifikation

Die TNM-Klassifikation ist ein international anerkanntes System für die Einstufung von Krebserkrankungen und wird von der *Union for International Cancer Control* (UICC) herausgegeben. Die Klassifikation dient als Grundlage für eine Therapieentscheidung und Prognose sowie die Überwachung und Kontrolle von Krebserkrankungen. Die Einteilung nach TNM umfasst die Tumorgröße und Tiefe der Invasion (T), das Vorhandensein und die Ausdehnung regionaler Lymphknotenmetastasen (N) sowie das Vorhandensein von Fernmetastasen (M) (*TNM Classification of Malignant Tumours* | UICC, n.d.).

In der achten Auflage des *American Joint Committee on Cancer* (AJCC) *Cancer Staging Manual* wurde nach den neusten Kenntnissen der Tumorforschung die TNM-Klassifikation um relevante

nicht-anatomische, molekulare Faktoren erweitert. Im Falle des HNSCC, welches ebenfalls der TNM- Klassifikation unterliegt, wird der HPV-Status im *Staging* berücksichtigt (Amin et al., Jahr). Den Neuerungen zufolge sind HPV-positive Plattenepithelkarzinome grundsätzlich als invasiv einzustufen. Die immunhistologische Positivität für p16 dient als Surrogatmarker für HPV- assoziierte HNSCC in der Diagnostik (Weichert et al., 2018). Die nachfolgende Tabelle (Tabelle 1) stellt die Stadien der aktuell gültigen TNM-Klassifikation für das HNSCC auf.

Tabelle 1: TNM-Klassifikation für das HNSCC

Stadium	Beschreibung
Tis	Carcinoma in situ
T1	Größte Ausdehnung < 2cm
T2	Ausdehnung ≥2cm aber nicht > 4cm
T3	Ausdehnung > 4cm
T4	Primärtumor infiltriert in benachbarte Strukturen
N0	Keine Lymphknotenmetastasen
N1	Solitäre ipsilaterale Lymphknotenmetastasen < 3 cm
N2a	Solitäre ipsilaterale Lymphknotenmetastasen 3 – 6 cm
N2b	Mehrere ipsilaterale Lymphknotenmetastasen < 6cm
N2c	Bi- oder kontralaterale Lymphknotenmetastasen < 6cm
N3	Lymphknotenmetastase/-n ≥6cm
M0	Keine Fernmetastase/-n
M1	Fernmetastase/-n

Anmerkung: Nach TNM UICC 8. Auflage (Wittekind, 2017) vereinfacht und modifiziert.

Abkürzungen: T: Tumor; N: Nodalstatus; M: Metastase

1.7 Therapie

Zur kurativen Behandlung eines Plattenepithelkarzinoms im Kopf-Hals Bereich stehen mehrere Behandlungsempfehlungen gemäß der S3-Leitlinie für Mundhöhlenkarzinome zur Verfügung. Diese beinhaltet die Behandlung mittels alleiniger chirurgischer Intervention, alleiniger Strahlentherapie, kombinierte Radio-Chemotherapie oder die Kombination aus chirurgischer Intervention und kombinierter Radio-Chemotherapie. Die Auswahl der Therapie richtet sich nach Lage und Größe des Primärtumors, dem Vorhandensein von Metastasen, dem

Allgemeinzustand der Patient:innen, den funktionellen und ästhetischen Konsequenzen der Therapie sowie dem voraussichtlichen Behandlungserfolg (Wolff, 2021).

Für ein lokal begrenztes frühes Tumorstadium (T1/T2, N0) wird für das HNSCC im kurativen Setting eine chirurgische Intervention mit tumorfreier Resektion (R0) empfohlen. Studien belegen bei Inoperabilität der Patient:innen ein gleichwertiges Outcome mit alleiniger Strahlentherapie. Bei präoperativen, durch Untersuchung und radiologisch bestätigen nodal-positiven Tumoren, erfolgt nach vollständiger Resektion (pT1/pT2, pN1) eine adjuvante kombinierte Radiochemotherapie (RCT) (Machiels et al., 2020). Gleicher Therapieansatz gilt für fortgeschrittene Tumore (T3/T4) unabhängig vom Nodalstatus. Ein Überlebensvorteil und verbesserte Tumorkontrolle konnten durch eine kombinierte Behandlung aus Strahlentherapie und Chemotherapie, im Vergleich zur alleinigen Bestrahlung, belegt werden (Pignon et al., 2009).

Die Strahlentherapie kann konventionell (1,8 - 2,0 Gy täglich, 5x/Woche) akzeleriert (>10 Gy/Woche) oder hyperfraktioniert (1,1 - 1,2 Gy, 2x täglich) erfolgen. Die Gesamtdosis sollte je nach Befund und Bestrahlungsschema zwischen 57,6 – 70 Gy liegen (Machiels et al., 2020).

Die Chemotherapie in der Erstlinientherapie sollte vorrangig mit Cisplatin oder anderen platinhaltigen Chemotherapeutika (Carboplatin) behandelt werden. Eine Chemotherapie mit 5-Fluor-Uracil ist als Alternative anwendbar (Pignon et al., 2009).

Cisplatin hat seit 1970 mit dem Beginn der zytotoxischen Anti-Tumor-Therapie, neben 5-Fluor-Uracil, den höchsten Stellenwert in der Standardtherapie. Es zeigt ein gutes Ansprechen (88,5%) bei unbehandelten Patient:innen. Der Mechanismus beruht bei Cisplatin auf der Störung der Quervernetzung von DNA-Bestandteilen. Die Wirkung von Carboplatin ist ein unspezifischer Eingriff in den Zellzyklus. 5-Fluor-Uracil zählt zu der Gruppe der DNA-Synthese-Inhibitoren und hemmt wie die Taxan-basierten Medikamente Docetaxel und Paclitaxel den Zellzyklus, wodurch sie zytotoxisch wirken.

Für die Behandlung rezidivierender und/oder metastasierender sowie Platin-resistenter HNSCC steht mit der Entwicklung von Antikörpertherapeutika eine weitere Behandlungsoption zur Verfügung.

Durch die Anwendung von Immun-Checkpoint-Inhibitoren kommt es zur Demaskierung der Tumorzellen und somit zur Reaktivierung der körpereigenen Immunreaktion gegen diese.

Zur Anwendung kommt unter anderem der monoklonale Antikörper Cetuximab. Er zählt zur Gruppe der epithelialen Wachstumsfaktor-Rezeptor-Inhibitoren (EGFR-Inhibitor). Die Immun-

Checkpoint-Inhibitoren Nivolumab und Pembrolizumab sind Anti-PD-L1 Antikörper. Die in der Therapie eingesetzten Antikörper führen in fortgeschrittenen, rezidivierenden oder metastasierenden HNSCC, aber auch im Platin-resistenten Tumoren zu einem verbesserten Gesamtüberleben.

Die Tabelle 2 gibt einen Überblick über die derzeit verwendeten Anti-Tumor-Medikamente im HNSCC.

Tabelle 2: Anti-Tumor-Medikamente für das HNSCC

Kategorie	Gruppe	Medikamentenname	Mechanismus	Effektivität
Zytostatika	Platin-basiert	Cisplatin	Inhibition der DNA-Quervernetzung	RR: 88,5 %
		Carboplatin	Adduktbindung an DNA	
	Taxan-basiert	Docetaxel	Inhibition der Depolymerisation	RR: 33-53 %
		Paclitaxel	Inhibition Zellzyklus	
Immunglobuline	Monoklonaler Antikörper	Cetuximab	EGFR Inhibition	OS: 10,1 Monate
Immun-Checkpoint Inhibitor	Anti-PD-1 Antikörper	Nivolumab	PD-1 Rezeptor Inhibition	OS: 7,7 Monate
		Pembrolizumab		OS: 14,7 Monate

Anmerkung: Aufgeführt sind die gängigen Medikamente zur Behandlung eines fortgeschrittenen, rezidierten oder metastasierten HNSCC. Sie umfassen klassische Zytostatika, Immunglobuline und Immun-Checkpoint-Inhibitoren. Die Auswahl wurde vereinfacht und modifiziert nach Kitamura et al., 2021.

Abkürzungen: HNSCC: *Head and Neck Squamosa-Cell Carcinoma*; PD-1: programmed cell death-1; OS: median overall survival; RR: response rate

Eine Entscheidungshilfe über den Einsatz von Immun-Checkpoint-Inhibitoren (Anti-PD1-Antikörper) in Platin-resistenten, rezidierten oder metastasierten Tumoren gibt der kombinierte positive Score (CPS). Der CPS ist ein diagnostisches Tool, welches die Expression eines Biomarkers, unter Berücksichtigung des Verhältnisses von vitalen Tumor- und Immunzellen, quantifiziert. Somit stehen unterschiedliche Kombinationsmöglichkeiten wie klassische Anti-Tumor-Medikamente oder neuere Immun-Checkpoint-Inhibitoren in den verschiedenen Stadien eines HNSCC zur Verfügung. Insgesamt führen die unterschiedlichen Kombinationen zu einer Verbesserung des Gesamtüberlebens (Cohen et al., 2019).

In *Abbildung 3* werden die unterschiedlichen Therapieoptionen für Patient:innen mit fortgeschrittenem rezidierten oder metastasierten HNSCC gezeigt (Kitamura et al., 2021).

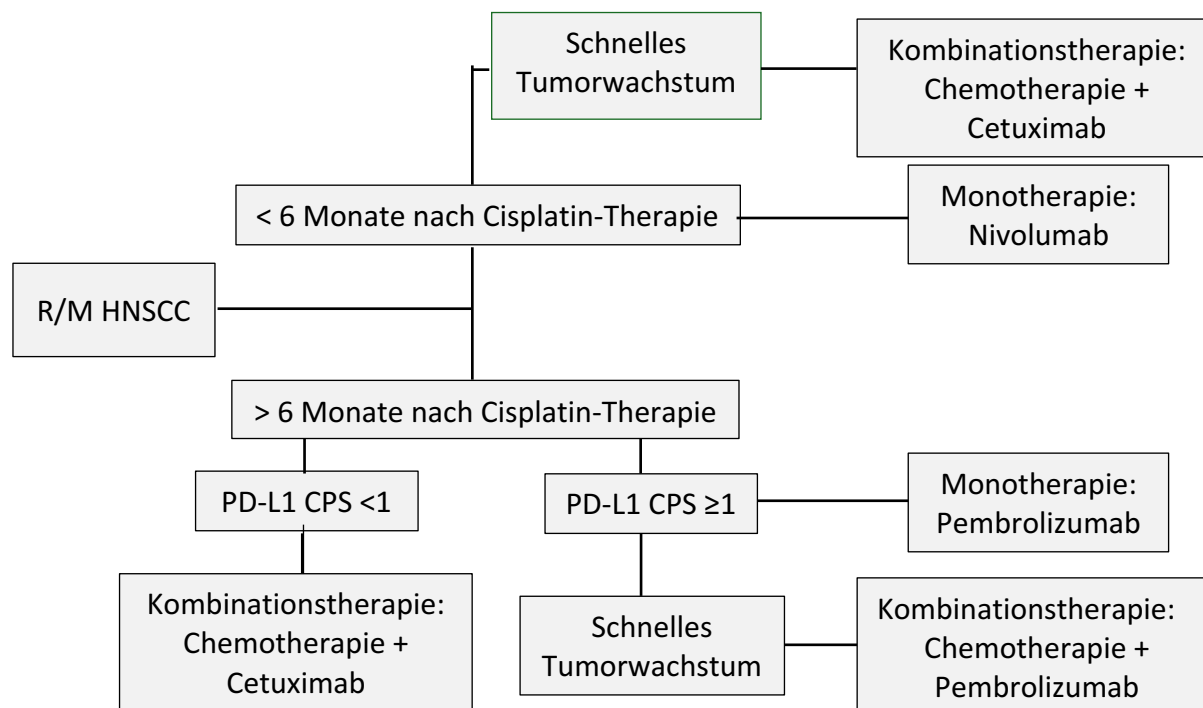


Abbildung 3: Therapiealgorithmus für das rezidierte oder metastasierte HNSCC

Bei Diagnose eines Rezidivs oder von Fernmetastasen stehen verschiedene Behandlungsoptionen des rezidierten- oder metastasierten HNSCC zur Verfügung. Patient:innen mit einer Zeitspanne <6 Monate nach Cisplatin-basierter Chemotherapie qualifizieren sich je nach Ausprägung des Tumors für eine Kombinationstherapie aus Chemotherapie und ICI oder alleiniger ICI. Bei einer Zeitspanne >6 Monate nach einer Cisplatin-basierten Chemotherapie ist der PD-L1 CPS eine Entscheidungshilfe. Patient:innen mit einem PD-L1 CPS <1 erhalten eine Kombinationstherapie aus Chemotherapie und ICI. Bei einem PD-L1 CPS ≥ 1 erhalten die Patient:innen je nach Ausprägung des Tumors eine alleinige ICI-Therapie oder eine Kombinationstherapie aus Chemotherapie und ICI. Vereinfacht und modifiziert nach (Kitamura et al., 2021).

Abkürzungen: R: Rezidiv; M: Metastase; HNSCC: *Head and Neck Squamous cell Carcinoma*; ICI: Immun-Checkpoint-Inhibitor; PD-L1: *Programmed-Death Ligand 1*; CPS: *Combined-Positive Score*

1.8 Untersuchte projektrelevante Moleküle und Signalachsen dieser Arbeit

Zum besseren Verständnis der im HNSCC ablaufenden Vorgänge wurden in dieser Studie verschiedene Moleküle und Signalachsen untersucht, die einen möglichen Einfluss auf die Tumorentstehung, Aufrechterhaltung des Tumors und Ansprechen der Therapie haben. Im Folgenden werden die entsprechenden Proteine und Signalkaskaden mit dem Fokus auf die im HNSCC relevanten veränderten Gegebenheiten beschrieben.

1.8.1 CKLF-like MARVEL transmembrane domain-containing Protein 6

CKLF-like MARVEL transmembrane domain-containing (CMTM) ist ein Protein, welches der Chemokin-ähnlichen Gen-Superfamilie angehört und in acht unterschiedlichen Varianten vorkommt (Zhao et al., 2021). Das für diese Arbeit wichtige Protein ist CMTM6.

CMTM6 nimmt sowohl bei der Tumorgenese als auch bei der Entwicklung möglicher Chemoresistenzen eine Schlüsselrolle ein. Funktionell schützt CMTM6 PD-L1 vor dem lysosomalen Abbau. CMTM6 induziert eine membranständige Stabilisierung von PD-L1. Neben der stabilisierenden Funktion von PD-L1 kommt es in Anwesenheit von CMTM6 zu einer gesteigerten Expression von PD-L1. Dies erfolgt über die Aktivierung verschiedener Signalkaskaden ohne dabei in die Transkription dieses Proteins einzugreifen (Zhao et al., 2021). Die gegenseitige Beeinflussung zwischen CMTM6 und PD-L1 lässt eine verbesserte Immunevasion der Tumorzelle vermuten. Studien belegen, dass es durch den Knockdown von CMTM6 zu einer verminderten Expression von PD-L1 kommt. Der Effekt ist ein vermehrtes Einwandern von TIL, was wiederum die körpereigene anti-tumorale Immunreaktion fördert (Chen et al., 2020).

Im Gegensatz dazu konnte die Arbeitsgruppe um Peng et al. zeigen, dass auch ein umgekehrter Mechanismus stattfinden kann. CMTM6 ist ein ubiquitär exprimiertes Protein. Eine hohe CMTM6-Expression führt zur Veränderung der Tumormikroumgebung. Einhergehend mit der erhöhten Expression von CMTM6 kommt es zu einer gesteigerten Anzahl von tumorinfiltrierenden Lymphozyten. Folglich ist bei vermehrter Expression mit einer verbesserten anti-tumoralen Abwehr und verminderten Immunevasion zu rechnen (Peng et al., 2021).

CMTM6 wird außerdem in Zusammenhang mit einer Cisplatin-Resistenz gebracht (Mohapatra et al., 2021). An Zellmodellen konnte gezeigt werden, dass in chemoresistenten Tumorzellen eine vermehrte Expression von CMTM6 stattfindet (ebd.).

Der molekulare Mechanismus einer Platin-Resistenz entsteht wahrscheinlich über die Modulierung des Enolase-1-AKT-GSK-3 β -Wnt- β -Catenin Signalwegs (Abbildung 4). Eine Stabilisierung der Enolase-1 durch CMTM6 führt zur vermehrten Phosphorylierung von AKT und GSK-3 β . Dadurch wird der Wnt- β -Catenin Signalweg aktiviert. In anderen Studien konnte bereits gezeigt werden, dass β -Catenin die Entstehung von Chemoresistenzen fördert (ebd.).

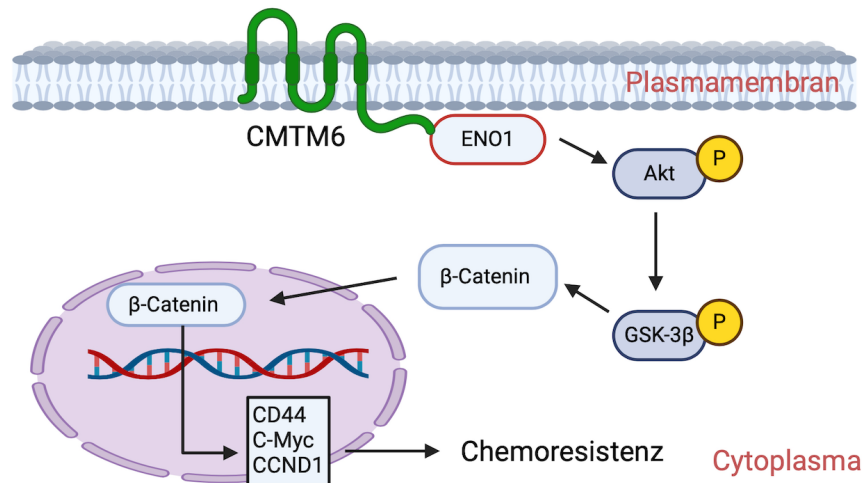


Abbildung 4: Entstehung von Chemoresistenz durch CMTM6

CMTM6 stabilisiert die Enolase-1. Dies führt zur Modulation des Enolase-1-AKT-GSK-3β-Wnt-β-Catenin Signalwegs. Die Produkte dieses Signalwegs begünstigen die Entstehung von Chemoresistenz. Abbildung modifiziert und vereinfacht nach (Mohapatra et al., 2021). Schematische Abbildung erstellt mit www.biorender.com.

Abkürzungen: CMTM6: *CKLF Like MARVEL Transmembrane Domaine 6*; AKT: Proteinkinase B; GSK-3β: Glykogensynthase-Kinase-3-β.

Daten aus dem human Proteintlas deuten darauf hin, dass Patient:innen mit einem HNSCC und einer hohen Expression von CMTM6 eine reduzierte Gesamtüberlebenswahrscheinlichkeit haben, im Vergleich zu Patient:innen mit niedriger CMTM6-Expression (THE HUMAN PROTEIN ATLAS, n.d.). Aktuell existiert noch kein standardisiertes und konkret definiertes Auswertungsschema für CMTM6. Somit ist dieser Effekt abhängig von den ausgewählten pathologischen Auswertungsschemata.

Verschiedene Tumorentitäten, wie das kolorektale und hepatozelluläre Karzinom, weisen hohe CMTM6-Expressionen auf. Unterschiede lassen sich unter diesem Gesichtspunkt im Gesamtüberleben und dem Ansprechen der Immuntherapie erkennen. Das Ansprechen der Immuntherapie korreliert zwar mit einer hohen CMTM6-Expression, das Outcome ist jedoch sehr unterschiedlich.

Mit zunehmendem Verständnis über den positiven Einfluss von CMTM6 auf das TME, das Expressionsmuster und die Aktivierung/Deaktivierung von Signalkaskaden kann, je nach Tumorentität, CMTM6 zukünftig als prädiktiver und prognostischer Biomarker etabliert werden (Zhang et al., 2022).

1.8.2 Programmed-Death-Ligand-1

Mutagene Veränderungen und Funktionsverlust von Tumorsuppressoren sowie deren nachgeschaltete Signalkaskaden führen zu Neoplasien im Kopf-Hals-Bereich. Im HNSCC lassen sich weitere spezifische regulatorische Mechanismen in Proteinen und Signalkaskaden zur Entstehung und Aufrechterhaltung tumoröser Veränderungen erkennen.

Ein für diese Arbeit wichtiges Protein ist der *Programmed Death Ligand 1* (PD-L1). PD-L1 ist ein transmembranes Glykoprotein, bestehend aus 290 Aminosäuren, mit einer extrazellulären Bindungsdomäne. Normalerweise wird PD-L1 im geringen Maße von Makrophagen, aktivierten T- und B-Zellen, dendritischen Zellen sowie Epithelzellen in inflammatorischen Zuständen exprimiert. Die Expression dient der Eindämmung von überschießenden Immunreaktionen, indem zytotoxische T-Zellen gehemmt werden (Han et al., 2020).

Derselbe Mechanismus lässt sich bei Tumorzellen beobachten. Durch die Induktion von PD-L1 durch die Tumorzelle, vorrangig induziert durch Interferon γ (IFN- γ) und Cytokine, kommt es zur verstärkten Bindung mit dem PD-1 Rezeptor. Dieser Rezeptor wird vorwiegend von CD8-positiven T-Zellen exprimiert. Die Rezeptor-Liganden-Bindung führt zur Inhibition der zytotoxischen T-Zellen. Die Folge ist eine Hemmung der Immunantwort mit entsprechender Immunevasion der Tumorzellen. Neben den durch IFN- γ ausgelösten NF- κ B Signalweg wird die Expression von PD-L1 zusätzlich durch die Signalwege PI3K/AKT, MAPK, JAK-STAT gefördert (Zhang et al., 2022).

Das Verständnis über diesen Mechanismus der Immunevasion führt zu einem neuen Behandlungsansatz mittels Immuntherapie.

Durch die Bindung von anti-PD-1 Antikörpern und seinem Liganden kommt es zur Aufhebung der Immununterdrückung durch die Tumorzelle. Folglich wird die gegen den Tumor gerichtete zytotoxische T-Zellantwort wiederhergestellt (Zander et al., 2020).

1.8.3 Proteinkinase B (AKT) Signalweg

AKT oder auch Proteinkinase B gehört zu der Familie der Serin-Threonin-Proteinkinasen, welche drei Mitglieder umfasst (AKT 1 - 3). Sie wird durch das Produkt der Phosphoinositol-3-Kinase (PI3K) aktiviert. Nachfolgend werden verschiedene Signalkaskaden induziert, wodurch Zellwachstum, Zellüberleben und Angiogenese verstärkt, sowie metabolische Mechanismen in Zellen verändert werden (Brolih et al., 2018).

Die PI3K phosphoryliert Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PIP₂) am 3er-Ende des Inositolrings zu Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat (PIP₃). Dies führt dazu, dass AKT an die Membran rekrutiert wird. Die *phosphoinositide-dependent kinase 1* (PDK1) phosphoryliert membranständiges AKT am Threoninrest 308. Diese Phosphorylierung stellt eine Teilaktivierung von AKT dar. Zur vollständigen Aktivierung von AKT ist eine weitere Phosphorylierung am C-terminalen Serin 473 nötig. Eine zentrale Rolle zur Deaktivierung der AKT-Signalachse spielt PTEN, welches PIP₃ wieder zu PIP₂ dephosphoryliert (Luo et al., 2003). Der Signalweg über PI3K/AKT/mTOR ist im HNSCC mit über 90 % der am häufigsten aktivierte Signalweg, unabhängig von HPV-positiven oder -negativen Tumoren (Marquard & Jücker, 2020). Auch krankhafte Aktivierungen in bereits davor geschalteten Signalmolekülen führen zur vermehrten Aktivität dieses Signalwegs (Loyo et al., 2013). Die dabei zu erwähnenden Signalmoleküle sind z.B. der Wachstumsfaktor EGF, sowie eine PI3K-Überexpression, durch Veränderung der *PI3CA*-Gene im Sinne von Amplifikationen oder Funktionsverlusten. Mutationen, die mit einem Funktionsverlust von PTEN einhergehen, onkogene Veränderungen von AKT selbst und nachgeschalteten Molekülen, sind ebenfalls Treiber dieses Signalwegs (Ghosh et al., 2022).

Das verbesserte Überleben von Tumorzellen durch die Aktivierung von AKT kann durch verschiedene Mechanismen erfolgen. Physiologisch kommt es zur einer durch PTEN initiierten Apoptose. Eine Inaktivierung von PTEN führt zu verminderter AKT Aktivität. Das Resultat ist eine verstärkte Phosphorylierung und somit Inaktivierung des *Bcl-2 associated agonist of cell death protein* (BAD) (Datta et al., 1997). Durch die Hemmung von BAD kommt es zu geringeren Apoptoseraten, sowie zur Induktion der anti-apoptotischen Eigenschaften von *B-cell lymphoma-extra large* (BCL-X). Dadurch wird das Zellüberleben gesichert (ebd.). Die Phosphorylierung der pro-apoptotischen Caspase-9 durch AKT führt zu deren Inaktivierung und fördert ebenfalls das Zellüberleben (Cardone et al., 1998). Durch die Phosphorylierung von *forkhead in rhabdomyosarcoma*-(FKHR)-Proteinen wie dem *Forkhead box protein O1* (FOXO1) kommt es zu einer Verhinderung der nukleären Translokation dieser Transkriptionsfaktoren. Dies führt zu einer verminderten Expression von pro-apoptotischen Proteinen wie z.B. des *BH3-only-protein* (BIM) und dem *Fas death factor* (FAS)-Ligand. Zusätzlich kommt es durch eine indirekte Aktivierung des nukleären Faktor κ B (NF- κ B)-Transkriptionskomplexes zur positiven Beeinflussung des Zellüberlebens. Die Phosphorylierung und somit Aktivierung des p53-Bindungs-Protein (MDM2) bewirkt eine vermehrte Ubiquitinierung von p53. Diese führt zu einem

verstärkten Abbau von p53, was ebenso das Überleben der Zelle sichert (Vivanco & Sawyers, 2002).

Zusätzlich fördert der Funktionsverlust von Tumorsuppressoren wie p53 oder PTEN eine Hochregulation des AKT-Signalwegs (Luo et al., 2003).

Der zellproliferative Einfluss von AKT erfolgt über die Phosphorylierung der GSK3. Dies führt zu einer Inhibition der GSK3 und somit zu einem verminderten Abbau von Cyclin D1. Cyclin D1 spielt eine entscheidende Rolle im Zellzyklus, im Speziellen beim Übergang von der gap-1-Phase (G1) in die Synthese-Phase (S). Durch eine Akkumulation von Cyclin D1 ist ein dauerhafter Phasenübertritt gewährleistet. Es kommt zur vermehrten Proliferation der Zellen (Diehl et al., 1998).

Das Zellwachstum wird über eine Serin-Threonin-Kinase *mammalian Target of Rapamycin* (mTOR) reguliert. Je nach Verfügbarkeit von Nährstoffen, führt die Expression von mTOR zur Hoch- oder Runterregulierung der Proteinbiosynthese. In Tumorzellen kommt es zu einer direkten Aktivierung der mTOR durch AKT und somit zum ungehinderten Zellwachstum (Vivanco & Sawyers, 2002).

In 62 % der HNSCC Fälle kommt es durch unterschiedlichste Mutationen im PI3K/AKT/mTOR Signalweg zur Hyperstimulation dieses Signalwegs und einem verbesserten Überleben der Tumorzellen ("Comprehensive Genomic Characterization of Head and Neck Squamous Cell Carcinomas," 2015).

Erhöhte Proliferationsraten und unzureichende Nährstoffzufuhr durch verminderte Vaskularisierung von Tumorzellen sorgen für ein Ungleichgewicht von Sauerstoffangebot und Sauerstoffverbrauch. Dieser hypoxische Stress führt zur Expression von verschiedenen Signalmolekülen wie *hypoxia-induced factor- α 1* (HIF- α 1), VEGF, EGFR, *platelet-derived growth factor* (PDGF), TNF- α und Cytokinen. Diese tragen alle zur Aktivierung von AKT bei, wodurch das Ergebnis eine vermehrte Angiogenese und Veränderung des Metabolismus in der Tumorzelle ist (Li et al., 2012).

Unter Hypoxie kommt es zu einer durch AKT induzierten Aktivierung der GSK-3 β . Auf diese Aktivierung folgt eine Anpassung der Zelle an die Stoffwechsellage, insbesondere der Glucosehomöostase. Dazu wird die Glycogensynthese gehemmt und die Glycolyse gesteigert. Die gesteigerte Expression von Glucose-1-Transportern (GLUT1) erleichtert die Aufnahme von Glucose in die Zellen (Xie et al., 2018).

Sowohl die Hypoxie als auch eine Akkumulation von Lactat, welches beim Abbau von Glucose in anaeroben Verhältnissen in der Zelle anfällt, führen zu einem sauren TME. Ein saures Tumormilieu scheint dabei verantwortlich für ein vermindertes Ansprechen auf Radio-Chemotherapie im HNSCC zu sein (Li et al., 2012).

1.8.4 Tumorsuppressor p53

Im regulär ablaufenden Zellzyklus werden durch Doppel- und Einzelstrangbrüche der DNA verschiedene Kinasen aktiviert. Diese Kinasen können p53 und Checkpoint-Kinasen phosphorylieren. Durch die Phosphorylierung dieser Kinasen kommt es zu Konformationsänderungen, wodurch sie aktiviert werden. MDM2 führt im intakten Zellzyklus zur Polyubiquitinierung von p53 und somit zu dessen Abbau. Damit wird das Voranschreiten des Zellzyklus gewährleistet. Die durch Kinasen hervorgerufene Konformationsänderung von MDM2, kommt es zur Lösung zwischen MDM2 und p53. Die dadurch ausbleibende Ubiquitinierung von p53 führt zu dessen Akkumulation und im Folgenden zum Zellzyklusarrest (Sullivan et al., 2018).

Nukleär gelagertes und aktiviertes p53, sowie zellulärer Stress oder Hypoxie in einer Zelle, führen zur Aktivierung von Cyclin-abhängigen Kinase-Inhibitoren (CDKI). Zu den CDKI zählen unter anderem die *cyclin-dependent kinase 1* (p21) und die *cyclin-dependent kinase 2A* (p16). Aktiviertes p53 initiiert die vermehrte Expression von p21. p21 ist in der Lage, die Freisetzung des Transkriptionsfaktors E2F zu verhindern. Durch das Fehlen des Transkriptionsfaktors kommt es zum Zellzyklusarrest (Dimri et al., 1996).

p16 bindet nach Aktivierung an Cyclin-abhängige Kinasen (Cyclin D). Cyclin D ist somit nicht mehr in der Lage RB zu phosphorylieren. Die unphosphorylierte Form von RB bindet den Transkriptionsfaktor E2F und inhibiert diesen. Essentielle Proteine für die DNA-Synthese werden beim Ausbleiben des Transkriptionsfaktors nicht mehr synthetisiert. Das Fehlen dieser Proteine sorgt für einen Arrest des Zellzyklus in der S-Phase (Rayess et al., 2012).

Mit der Aktivierung von p53, p21 und p16 kann das Voranschreiten des Zellzyklus effektiv verhindert werden.

p53 ist ein ubiquitär vorkommendes Protein und sowohl in neoplastisch veränderten als auch normalen Zellen zu finden. Dies erlaubt die Unterteilung in die Subgruppen des Wildtyps von p53 (normale Funktion), die mutierte Variante, oder die im HPV-positiven Tumoren durch die

Virusproteine E6/7 veränderten p53-Subtypen. Die *Tp53*-Mutation stellt eine der meist vorkommenden, genetischen Aberrationen im nicht kutanen Plattenepithelkarzinom dar (de Bakker et al., 2022).

Im HPV-negativen HNSCC kommt es in den meisten Fällen zur Inaktivierung von p53 durch eine Mutation im *p53*-Gen. Die durch Genanalyse identifizierten Mutationen betreffen vor allem die genbindenden Anteile von p53 oder deren Faltung und führen so zum Funktionsverlust (J. M. Chen et al., 2001).

Ein ähnlicher Mechanismus ist im Fall von HPV-positiven Karzinomen beschrieben. Bekannte virale Protoonkogene sind Proteine, die essenziell für die virale DNA-Replikation, Transkription, erneute Verpackung des Virusgenoms, sowie die Initiierung der primären Infektion des Virus sind. Für das HP-Virus sind als Protoonkogene das Protein E6 und E7 identifiziert. E6 interagiert mit einem weiteren Virus-assoziierten Protein und aktiviert so eine Ubiquitinligase. Die Aktivierung der Ligase führt zur Ubiquitinierung von p53 und somit zu dessen vermehrtem Abbau. Neben dem Protein E6 nimmt auch das Protein E7 eine tumorfördernde Rolle ein. E7 bewirkt den Abbau von RB, wodurch ein Zellzyklusarrest verhindert wird und sich die Zelle ungehindert teilen kann. Zudem kommt es durch E7 zu einer Akkumulation von p16. Diese Überexpression von p16 wird als diagnostischer Marker für HPV-positive Karzinome genutzt (Rampias et al., 2014).

1.8.5 Tumorsuppressor p21

p21 fungiert im Zellzyklus als Cyklin-abhängiger Kinase-Inhibitor und kann somit die Zelle an zwei verschiedenen Punkten, beim Übertritt von G1- zu S- und G2- zu M2--Phase, in den Zellarrest versetzen (Bertoli et al., 2013).

Die Expression von p21 kann über p53-abhängige und -unabhängige Signalwege erfolgen. So führen verschiedenste Zellstressoren, DNA-Beschädigungen oder oxidativer Stress zur Induktion von p53 und nachgeschaltet auch von p21 (Jung et al., 2010).

Eine vermehrte, p53-unabhängige p21-Expression kann zum Beispiel durch Wachstumsfaktoren erfolgen (Roninson, 2002).

Interessant für diese Arbeit ist die Regulierung von p21 im cytoplasmatischen Kompartiment. Hier kommt es, im Gegensatz zur nukleären Regulation, nicht zum Zellzyklusarrest und Apoptose, sondern vielmehr zu einem anti-apoptotischen und zellproliferativen Effekt.

Ausgelöst durch eine Phosphorylierung von AKT kommt es, über eine nachfolgende Aktivierung verschiedene Substrate, zu einem besseren Zellüberleben. Die Phosphorylierung von p21 durch AKT führt zur gestörten Bindung zwischen dem *Proliferating-Cell-Nuclear-Antigen* (PCNA) und p21. PCNA kann durch die fehlende Bindung von p21 ungehindert die DNA-Polymerase aktivieren. Die entstehenden DNA-Schäden können durch den zelleigenen Reparaturmechanismus nicht ausreichend behoben werden. Aufgrund der dauer- und fehlerhaften Transkription kann es zur Entartung der Zelle kommen (Jung et al., 2010b).

Eine Phosphorylierung von p21 führt ebenso zur gesteigerten Aktivität von CDK2. CDK2 ist verantwortlich für den Übertritt von der G1- in die S-Phase. Das Voranschreiten des Zellzyklus wird durch die vermehrte Aktivität von CDK2 positiv beeinflusst (Zhou et al., 2001).

Der Effekt von p53 und p21 auf den Zellzyklus kann durch AKT verringert werden. Die Phosphorylierung von MDM2 durch AKT führt zu einer verstärkten Ubiquitinierung von p53 und dessen Abbau. Aufgrund des Zusammenspiels zwischen p53 und p21 kommt es bei vermehrtem Abbau von p53 zur verminderten Expression von p21 und somit zu einem gehemmten Zellzyklusarrest. Eine dauerhaft voranschreitende Zellproliferation ist somit durch die insuffiziente Hemmung des Zellzyklus gesichert (Karimian et al., 2016).

1.9 Zielsetzung

Patient:innen mit einem rezidierten, metastasierten oder Platin-resistenten HNSCC haben sich entsprechend für eine ICI-Therapie in der Zweitlinientherapie mit einem Anti-PD-L1-Antikörper qualifiziert (Ghosh et al., 2022). Die Erfolgsrate einer ICI-Therapie liegt aktuell bei ca. 20 % (Z. Chen et al., 2022). Neben der Bestimmung des PD-L1-Status muss die Diagnostik um weitere zuverlässige Biomarker mit gutem prädiktivem und prognostischem Wert ergänzt werden. Ziel ist eine zuverlässige Vorhersage über das Ansprechen einer Immuntherapie zu erhalten (Zander et al., 2020).

Wie in der Literatur beschrieben kommt es unter einer CMTM6-Expression zur membranständigen Stabilisierung und Regulierung von PD-L1 (Zhang et al., 2022). Ebenfalls relevant ist der Eingriff von CMTM6 in die AKT und p21 Signalwege. Diese Signalwege fördern die Tumorgenese, das Zellüberleben, die Zellproliferation und beeinflussen das TME (Vivanco & Sawyers, 2002).

Abgeleitet daraus ergaben sich für diese Studie folgende Fragestellungen:

- a. Wie hoch ist die prädiktive Wertigkeit von CMTM6 im HNSCC?
- b. Bestehen Korrelationen zwischen der CMTM6 und PD-L1 Koexpression im HNSCC?
- c. Wie beeinflusst die Wechselwirkung von CMTM6 mit den AKT und pAKT Signalwegen sowie den p53 und p21 Signalwegen die Pathogenese von HNSCC?

Um diese Fragestellungen zu beantworten, untersuchten wir zunächst die Koexpression zwischen CMTM6 und PD-L1 in HNSCC. Ziel war es auch, potenzielle Regulationsmechanismen der CMTM6-Expression anhand deskriptiver Analysen aufzudecken. Dazu wurde die AKT-, pAKT-, p53- und p21-Expression in Abhängigkeit vom CMTM6-Status analysiert. Im letzten Schritt wurde der Einfluss der CMTM6-Expression auf das progressionsfreie- und Gesamtüberleben überprüft.

2 Material und Methoden

2.1 Patientenkollektiv

Die Erstellung des retrospektiven Patientenkollektivs erfolgte anhand der nachfolgenden Einschlusskriterien:

1. Bei der Erstdiagnose handelt es sich um ein typisches HNSCC oder *Cancer of Unknown Primary* (CUP).

Das HNSCC umfasst nach ICD10 (*International Statistical Classification of Disease and Related Health Problems*) folgende anatomische Areale: die Mundhöhle, Larynx, Oropharynx, Hypopharynx oder lokale, gesicherte Halslymphknoten. Gemäß der Klassifikation umfasst es für dieses Kollektiv die Ziffern C00.1-C06.0, C09.0-C10.0, C12.0-13.0, C32.0 sowie C77.0 und C80.0.

2. Das histologische Probenmaterial wurde vor Beginn der adjuvanten Leitlinientherapie für das HNSCC gesichert und lag eingebettet in Paraffinblöcken vor. Eine ausreichende Tumormenge des Probenmaterials war essentiell für die Erstellung eines *Tissue-Micro-Array* (TMA).
3. Ein weiteres Kriterium stellte der zeitnahe Beginn der Therapie nach klinischer und histologischer/pathologischer Diagnosesicherung dar. Die Patient:innen erhielten individuell nach Staging entweder eine adjuvante kombinierte Radio-Chemo-Therapie (RCT), Radiotherapie (RT), Exzision, Radio-Immuntherapie oder, wenn aus klinischen Gegebenheiten nicht anders möglich, keine weitere Therapie.

Der Einschlusszeitraum erstreckte sich vom 01/2008 bis 05/2021. Der Beobachtungszeitraum wurde bis 09/2022 fortgeführt.

Alle in der Studie eingeschlossenen Patient:innen befinden oder befanden sich an der Universitätsmedizin Rostock (UMR) in Behandlung.

Die follow-up Daten wurden durch das Krebsregister Mecklenburg-Vorpommerns bereitgestellt. Sie beinhalten relevante klinisch-pathologische Parameter (cTNM, pTNM, Differenzierungsgrad), Sterbe- und Rezidivdaten sowie Therapieart. Nicht im Krebsregister enthaltene klinische Informationen wurden über die klinikinterne Informationsdatenbank (SAP) recherchiert.

2.2 Herstellung von Tissue-Micro-Arrays

Durch das Erstellen eines *Tissue-Micro-Arrays* (TMA) wird ermöglicht, mehrere Gewebeproben der eingeschlossenen Tumore in direkter Gegenüberstellung zu vergleichen (Simon et al., 2010).

Primär wurden im Archiv des Instituts für Pathologie der Universitätsmedizin Rostock sämtliche mit Hämatoxylin-Eosin (HE) gefärbte Präparatobjektträger der im Kollektiv eingeschlossenen Patient:innen identifiziert. Zusätzlich wurden die dazugehörigen, formalin-fixierten, in Paraffin eingebetteten, Gewebepblöcke aus dem Archiv gesichtet und den entsprechenden Patient:innen zugeordnet. Als Gewebeproben standen je nach klinischem Setting entweder die Probe-Exzision aufgrund einer diagnostischen Abklärung oder das Tumorsektat bei Zustand nach onkologisch-chirurgischer Primärintervention zur Verfügung.

Jede in die Pathologie eingehende Gewebeprobe der Universitätsmedizin Rostock erhält eine spezifische Eingangsnummer, welche die Zuordnung zwischen Patient:innen und Probe gewährleistet. Anhand dieser wurde von den in die Studie eingeschlossenen Patient:innen eine Vorlage des TMA erstellt. Dies sicherte später die korrekte Zuordnung zwischen gestanztem Core und Patient:innen.

Nach lichtmikroskopischer Sichtung der Präparatobjektträger wurden die tumortragenden Areale auf dem Objektträger markiert und mit den vorhandenen, eingebetteten Gewebeproben verglichen. Dies diente dazu, die tumortragenden Areale der Donorblöcke genau zu identifizieren.

Für das Stanzen der Cores des TMA wurde ein manueller *TMArrayer* der Firma Beecher Instruments, Silver Spring, MD, USA verwendet. Dort wurde eine Stanznadel mit 1 mm Innendurchmesser eingespannt.

Zunächst wurde aus einem gewebefreiem Paraffinblock ein Stanzzylinder heraus gestanzt, welcher im nächsten Schritt mit einem tumortragenden Core erneut bestückt wurde. Dieses Prozedere wurde pro Patient:in drei Mal wiederholt, sodass eine repräsentative Menge an Tumorgewebe für die Auswertung zur Verfügung stand.

Ein vollständiger TMA-Block umfasst in dieser Arbeit pro Reihe vier Patient:innen und ist mit acht Reihen bestückt. Zur Orientierung für die lichtmikroskopische Auswertung wurde in Reihe acht der letzte Patient:in ausgelassen, sodass hier lediglich von drei Patient:innen die entsprechenden Cores untergebracht wurden. Aufgrund der Patient:innenanzahl wurden insgesamt acht TMA-Blöcke erstellt.

Anschließend wurden die angefertigten TMA-Blöcke in einem Wärmeschrank für 30 Minuten auf 37 °C erwärmt. Hintergrund der Erwärmung ist, dass alle Gewebestanden in einer Ebene zu liegen kommen und die eingefügten Stenzen sich mit dem Paraffin des Empfängerblocks verschmelzen. Beides führt anschließend zu einem besseren Schneideergebnis der Empfängerblöcke.

Abschließend wurden 1 - 2 µm dünne Gewebeschnitte des TMA angefertigt, welche einer HE-Färbung sowie einer immunhistochemische Färbung mit den entsprechenden Antikörpern für p53, p21, AKT und pAKT unterzogen wurden.

2.3 HE-Färbung

Für die Auswertung wurden zunächst 3 µm dicke Schnitte des TMA angefertigt. Diese wurden in HE gefärbt und dienten als Neutralschnitt. Anhand dieser Schnitte wurde der Anteil des erfassten Karzinomgewebes pro Stanze ausgewertet. Fälle mit <10 % Tumorgewebe in den 3 Stenzen wurden von der weiteren Evaluation ausgeschlossen.

2.4 Immunhistochemische Färbung

Die immunhistochemische Färbung (IHC) ermöglicht die Untersuchung von Geweben hinsichtlich ihrer Zell- und Gewebestrukturen durch Antigen-Antikörperbindung. Die immunhistochemische Färbung erfolgt in mehreren standardisierten Schritten. Der erste Schritt beinhaltet die Antigen-Demaskierung. Dieser Schritt kann durch eine physikalische (Wärme oder Ultraschall) oder chemische Behandlung (Enzymverdau oder Denaturierung) erfolgen. Häufig kommen beide Verfahren zur Anwendung (D'Amico et al., 2009). Als nächstes wird das Präparat mit einem mono- oder polyklonalem Primärantikörper inkubiert, welcher an den für ihn spezifischen Epitopen des Antigens bindet. Danach erfolgt die Hinzugabe eines Sekundärantikörper. Dieser bindet spezifisch an den Primärantikörper und ist entweder mit einem Enzym oder fluoreszierendem Molekül gekoppelt. Im letzten Schritt können die markierten Antigene entweder durch eine Enzymreaktion, die einen Farbausschlag erzeugt, oder mittels Belichtung bei einem Fluoreszenzfarbstoff-gekoppeltem Antikörper, sichtbar gemacht werden (Hussaini et al., 2023).

2.5 Verfahren der immunhistochemischen Färbung des TMA

Für die IHC wurden 1 - 2 µm dünne TMA-Gewebeschnitte verwendet, die einer entsprechenden Vorbehandlung unterzogen wurden.

Zur Antigen-Demaskierung wurden zunächst die Gewebeschnitte für 20 Minuten bei 97 °C erhitzt. Dadurch gelingt es, Epitope zu Demaskieren und somit im Verlauf eine ausreichende Epitop-Antikörper-Bindung zu garantieren.

Im Anschluss werden die Gewebsschnitte für 5 Minuten in einem Peroxidase-blockierenden Puffer inkubiert. Dieser Schritt hat das Ziel, unerwünschte, nicht spezifische Antigen-Antikörper-Bindungen oder Interaktionen mit anderen Molekülen zu unterbinden. Auch bei hochspezifischen Antikörpern könnte es beim Entfallen dieses Schrittes zu einem verfälschten Färbemuster kommen, sodass die spezifische Antikörper-Antigen-Bindung nicht ausreichend visualisiert werden könnte.

Während der IHC-Färbung wird ein Primärantikörper in das Gewebe eingebracht, welches dann für 20 Minuten mit dem Antikörper inkubiert wird. Dieser bindet spezifisch an den entsprechenden Zielepitopen. Die verwendeten primären Antikörper werden im folgenden Abschnitt näher beschrieben.

Im letzten Schritt wird der primäre Antikörper an seinem Fc-Anteil von einem sekundären Antikörper gebunden. Dieser spezielle Antikörper enthält ein Chromomogen, hier 3,3'-Diaminobenzidin (DAB). Die Anwesenheit von Oxidasen führt es zu einem Farbumschlag. Der sekundäre Antikörper wird in einem vorgefertigten Kit (Dako-Kit K800) bereitgestellt. Sämtliche Färbeschritte erfolgen gemäß Herstellerangaben nach einem standardisierten Färbeprotokoll in einem vollautomatisierten Färbeautomaten (Autostrainer link 48) der Firma Dako (Hamburg, Deutschland).

Die Gegenfärbung der Gewebeproben erfolgt mittels Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE). Zudem werden entsprechende positiv- und negativ-Kontrollen für den jeweiligen Antikörper angefertigt.

2.6 Antikörper

Die in dieser Arbeit verwendeten Antikörper werden in Tabelle 3 zusammengefasst. Alle der aufgeführten Antikörper wurden mit einem vorgefertigten Kit (EnVision Flex High pH Link; Code: K8000) der AgilentDako® (Santa Clara, United States) vorbehandelt.

Tabelle 3: Verwendete Antikörper für die immunhistochemische Färbung des TMA

Protein	Antikörper	Hersteller	Verdünnung
CMTM6	Anti-CMTM6 [EPR23015-45]; Monoklonal von Kaninchen	Abcam®	1:1000
PD-L1	Anti-PD-L1, Klon 22C3; Monoklonal von Mäusen	Agilent®	1:50
AKT	Polyklonal von Hasen; [EPR1798]	Abcam®	1:500
pAKT	Phospho-AKT (Ser473); Klon D9E; [EP2109Y] Monoklonal von Hasen	Abcam®	1:50
p53	Anti-Human p53 Protein; Klon DO-7; [M7001] Monoklonal von Mäusen	Dako	1:100
p21	Human WAF1 Protein; Klon: 4D10 Monoklonal von Mäusen	Novocastra™ Liquid; Leika BIOSYSTEMS	1:100

Abkürzungen: CMTM6: *CKLF Like MARVEL Transmembrane Domaine 6*; PD-L1: *Programmed cell death ligand 1*; AKT: Proteinkinase B; pAKT: phosphorylierte Proteinkinase B; p21: Tumorsuppressor 21; p53: Tumorsuppressor 53

2.7 Lichtmikroskopische Auswertung Tissue-Micro-Array

Die mit den verschiedenen Antikörpern immunhistochemisch gefärbten Cores wurden mikroskopisch an einem Lichtmikroskop, Modell Axioskop 50 der Firma Carl Zeiss® (Jena, Deutschland), gesichtet. Anschließend wurden sie hinsichtlich verschiedener Parameter ausgewertet. Zur Dokumentation wurden verschiedener Ausschnitte der gefärbten Cores mit einer AxioCam 305 color Mikroskopkamera (Carl Zeiss®, Jena, Deutschland) fotografiert.

2.7.1 Kombiniertes positiver Score für den *Programmed Death Ligand 1* und *CKLF-like MARVEL transmembrane domain-containing Protein 6*

Der kombinierte Positiv-Score (*combined positive score* = CPS) ist ein diagnostisches Tool um das Ansprechen des Tumors auf eine etwaige Therapie einzuschätzen. Der Score stellt somit beim Einsatz von entsprechenden Biomarkern einen prädikativen Wert dar.

Er setzt sich aus der Summe der gefärbten Tumorzellen und der positiv gefärbten Immunzellen in Relation zur Gesamtzahl aller vitalen Tumorzellen zusammen (siehe Formel). Zu den Immunzellen zählen Lymphozyten und Makrophagen. Der Quotient wird anschließend mit 100 multipliziert (Ambrosini-Spaltro et al., 2022). Definitionsgemäß liegt die Obergrenze des Scores bei 100.

$$CPS = \frac{\text{positive Tumorzellen} + \text{positive Immunzellen}}{\text{Gesamtzahl aller vitaler Tumorzellen}} \times 100$$

Wie in der Literatur gebräuchlich wird für den Biomarker PD-L1 CPS auch in dieser Arbeit ein Cut-off von ≥ 1 = positiv gesetzt.

Für das Protein CMTM6 existiert zum aktuellen Zeitpunkt noch kein einheitliches Auswertungsschema. Analog zu PD-L1 wurde für CMTM6 der CPS berechnet und sich an dessen Median (25) orientiert. Anhand von ROC-Analysen wurde ein Cut-off von ≥ 10 gewählt. Somit lässt sich der CMTM6-CPS in hoch positiv (CPS ≥ 10 = *high*) und niedrig positiv (CPS < 10 = *low*) kategorisieren.

2.7.2 Anfärbbarkeit der Antikörper für die Proteinkinase B, phosphorylierte Proteinkinase B und Tumorsuppressor 53

Hinsichtlich der Anfärbbarkeit wurde unterschieden, ob in den Cores eine starke oder schwache Färbung vorliegt. Je Präparat wurden aus dem tumortragenden Areal drei Cores gestanzt. Dies sollte zum einen die Tumorerheterogenität abbilden und ausreichend Tumorgewebe repräsentieren, zum anderen die Auswertung in unklaren Fällen anhand einer Mittelwertbildung objektivieren. Dies ermöglichte in jedem Fall eine Zuordnung der jeweiligen Gewebeausschnitte in eine der beiden Kategorien. Dieses Verfahren wurde bei den Färbungen für die Antikörper AKT und pAKT vorgenommen. Für diese Antikörper wurde sowohl die membranöse als auch zytoplasmatische Reaktivität beurteilt. Die dreistufige Einteilung der Tumorproben erfolgte in negative, schwache oder starke Anfärbbarkeit.

Beim Antikörper für p53 wurde nur die nukleäre Reaktivität beurteilt. Beim Färbeverhalten wurde in stark-, schwach- und nicht-färbbar (komplett negativ) unterschieden. Bei einer starken Färbung ist von einer Akkumulation von p53 und somit von einer Mutation im *TP53*-

Gen auszugehen. Eine schwache und inhomogene Färbung spricht für den *TP53*-Wildtyp mit ggf. reaktiver Steigerung der p53-Expression, was im geringen Maße ubiquitär in jeder Zelle vorkommt. Bei keiner Färbung ist von einer trunkierenden *TP53*-Mutation mit Ausfall des p53 Proteins auszugehen (Osakabe et al., 2024).

2.7.3 Prozentualer Anteil der gefärbten Zellen im Tumor für die Proteinkinase B, phosphorylierte Proteinkinase B und Tumorsuppressor 21

Für die Antikörper von p21, AKT und pAKT wurde zusätzlich untersucht, wie viele Zellen im prozentualen Anteil zum restlichen Tumorgewebe angefärbt werden konnten.

Für die Marker AKT und pAKT wurden Abstufungen von <1 %, 1 - 20 %, 20 - 50 % und >50 % gewählt, welche später in Kombination mit der Anfärbbarkeit der Zellen in einem semiquantitativen Score berücksichtigt wurden.

Nach Ermittlung des prozentualen Anteils der p21-positiven Zellen wurden diese, je nach Ausprägung und Über- bzw. Unterschreitung des Cut-offs für p21, in die Kategorien mit erhaltener oder erloschener Funktion eingruppiert.

Da eine geringe p21-Expression für eine vitale Zelle normal ist, wurde, in Anlehnung an die Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen, in dieser Arbeit ebenfalls ein Cut-off von 30 % für p21 definiert (SHIOZAKI et al., 2013).

2.7.4 Semi-quantitativer Score für die Proteinkinase B und die phosphorylierte Proteinkinase B

Der Remmele Score, auch *Immunreaktiver Score* (IRS) nach Remmele und Stegner, ist ein Scoring-System zur Quantifizierung des Hormonrezeptorgehalts von Östrogen- und Progesteronrezeptoren im Mammakarzinom. Es handelt sich um einen Multiplikationsscore aus Färbeintensität und Anteil der positiven Zellen für die entsprechend gefärbten Proteine. Das Ergebnis ist der IRS, welcher die Werte von 0 - 12 hat (Remmele & Stegner, 1987).

$$IRS = \text{Färbeintensität} \times \text{Anteil der positiven Zellen}$$

Der Score wurde in dieser Arbeit auf die Färbeintensität und Anzahl der positiven Zellen für die Proteine AKT und pAKT übertragen. Angepasst wurden Werte von 0 (= <1 % Zellen), 1 (= 1 – 20

% Zellen), 2 (= 20 - 50 % Zellen) und 3 (= ≥ 50 % Zellen) sowie für die Färbeintensität 0 (keine Färbung), 1 (= schwache Färbung) und 2 (= starke Färbung) vergeben. Somit ergaben sich IRS-Werte von 0 bis 6. Der Cut-off-Wert für die Positivität der Tumorzellen hinsichtlich der Antikörper AKT und pAKT wurde auf einen Score von ≥ 5 festgelegt. Somit lässt sich der Score für diese Arbeit folgendermaßen interpretieren: bei einem Wert von ≥ 5 kommt es in mehr als 50 % der Zellen zu einem verstärkten Vorkommen von AKT und pAKT. Dies präsentiert sich in einer verstärkten Färbeintensität.

Tabelle 4 fasst die verwendeten Scores der gefärbten Antikörper mit den dazugehörigen Cut-offs und Spannweiten zusammen:

Tabelle 4: Zusammenfassung der immunhistochemischen Färbungen und der dazugehörigen Scores

Marker	Score	Cut-off/ Spannweite [min;max]
CMTM6	CPS	Cut-off: CMTM6 <i>high</i> : ≥ 10 Cut-off: CMTM6 <i>low</i> : < 10 [0,1; 100]
PD-L1	CPS	Cut-off: ≥ 1 % [0;100]
AKT	Semi-quantitativer Score	Cut-off: ≥ 5 [0;6]
	Prozentualer Anteil der Gefärbten Zellen	[< 1 %; ≥ 50 %]
	Anfärbbarkeit	Stark- normal- schwach
pAKT	Semi-quantitativer Score	Cut-off: ≥ 5 [0;6]
	Prozentualer Anteil der Gefärbten Zellen	[< 1 %; ≥ 50 %]
	Anfärbbarkeit	Stark- schwach- negativ
p21	Prozentualer Anteil der Gefärbten Zellen	Cut-off: ≥ 30 % [0;100]
p53	Anfärbbarkeit	Stark- normal- schwach

Anmerkung: Die Tabelle fasst die immunhistochemisch gefärbten Antikörper am TMA mit ihren jeweils dazugehörigen Scores, Cut-off Werten und Spannweiten zusammen.

Abkürzungen: CMTM6: *CKLF Like MARVEL Transmembrane Domaine 6*; PD-L1: *Programmed cell death ligand 1*; AKT: *Proteinkinase B*; pAKT: *phosphorylierte Proteinkinase B*; p21: *Tumorsuppressor 21*; p53: *Tumorsuppressor 53*; CPS: *Combined Positive Score*

2.7.5 Abbildungen der immunhistochemischen Färbungen

Die nachfolgenden *Abbildung 5a-l* zeigen immunhistochemische Färbung mit den projektrelevanten Antikörpern an Präparaten des ausgewählten Kollektivs:

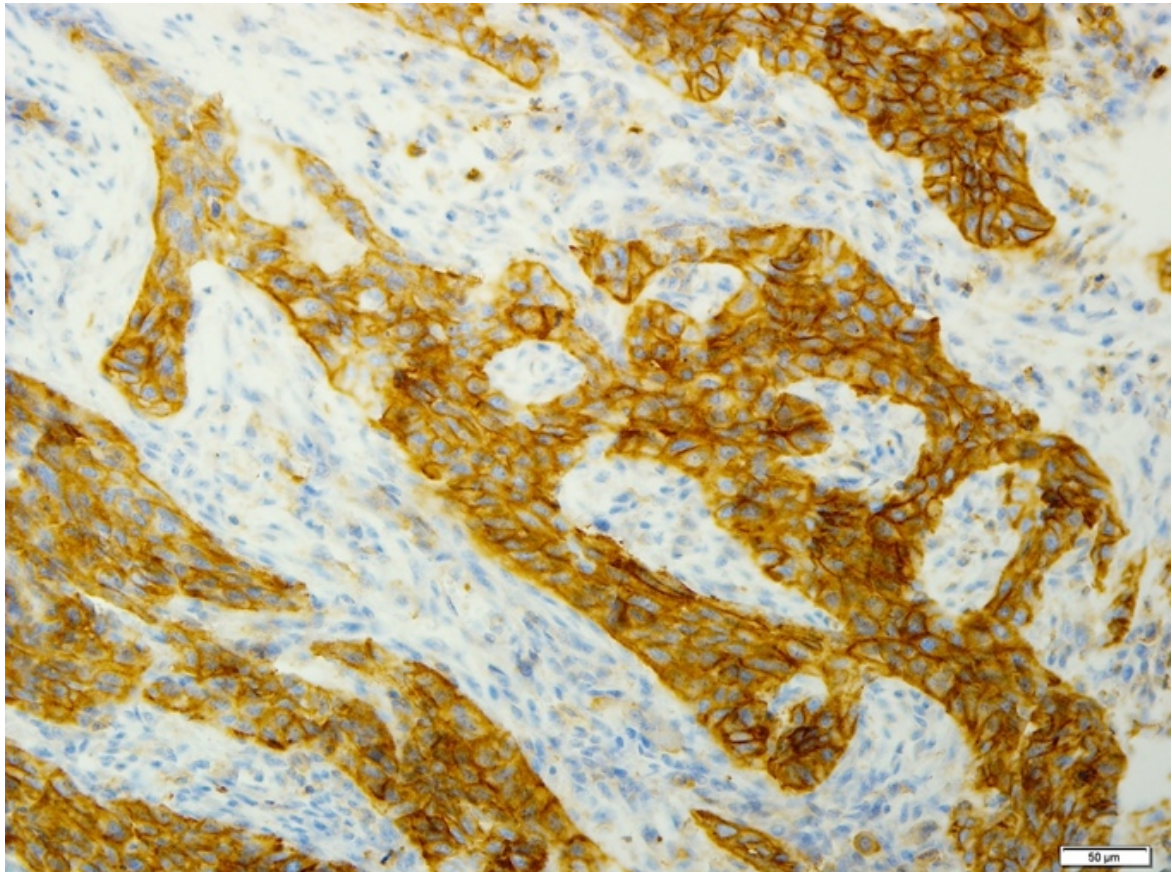


Abb.: 5a

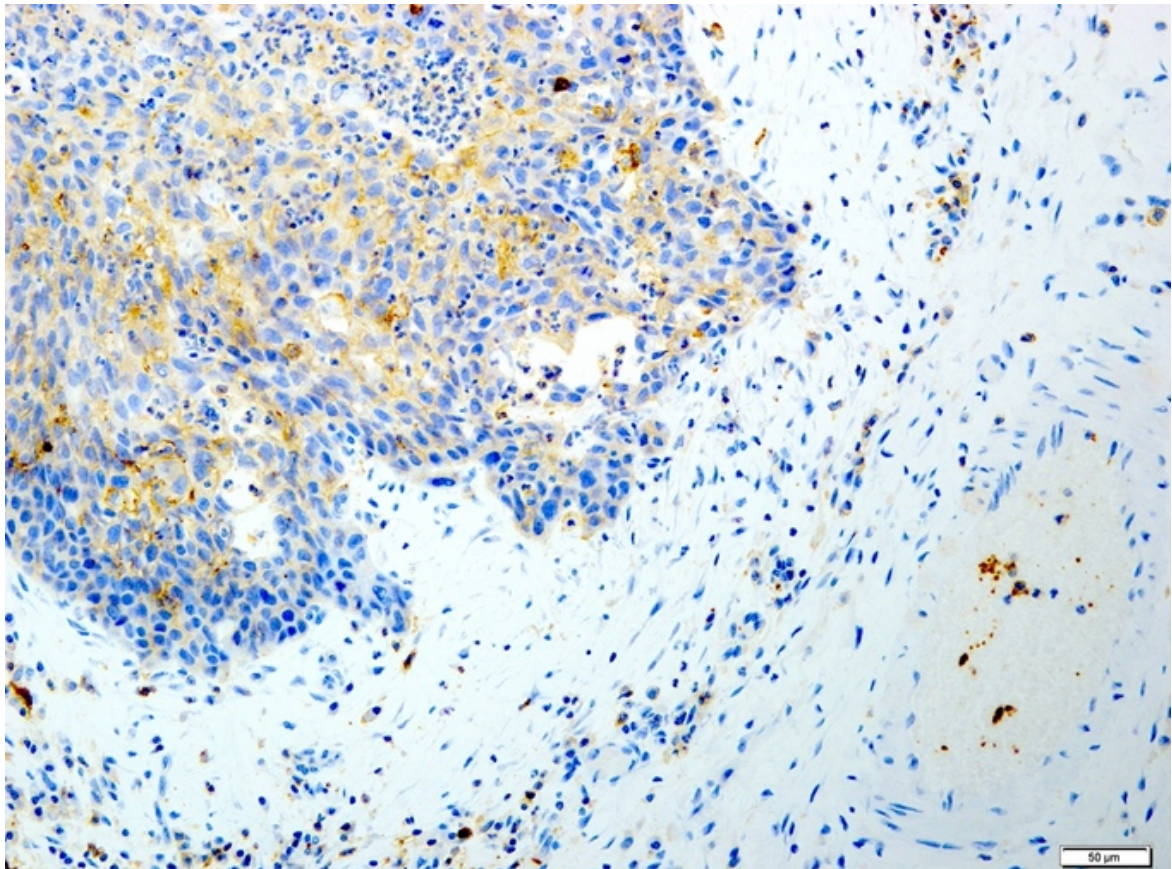


Abb.: 5b

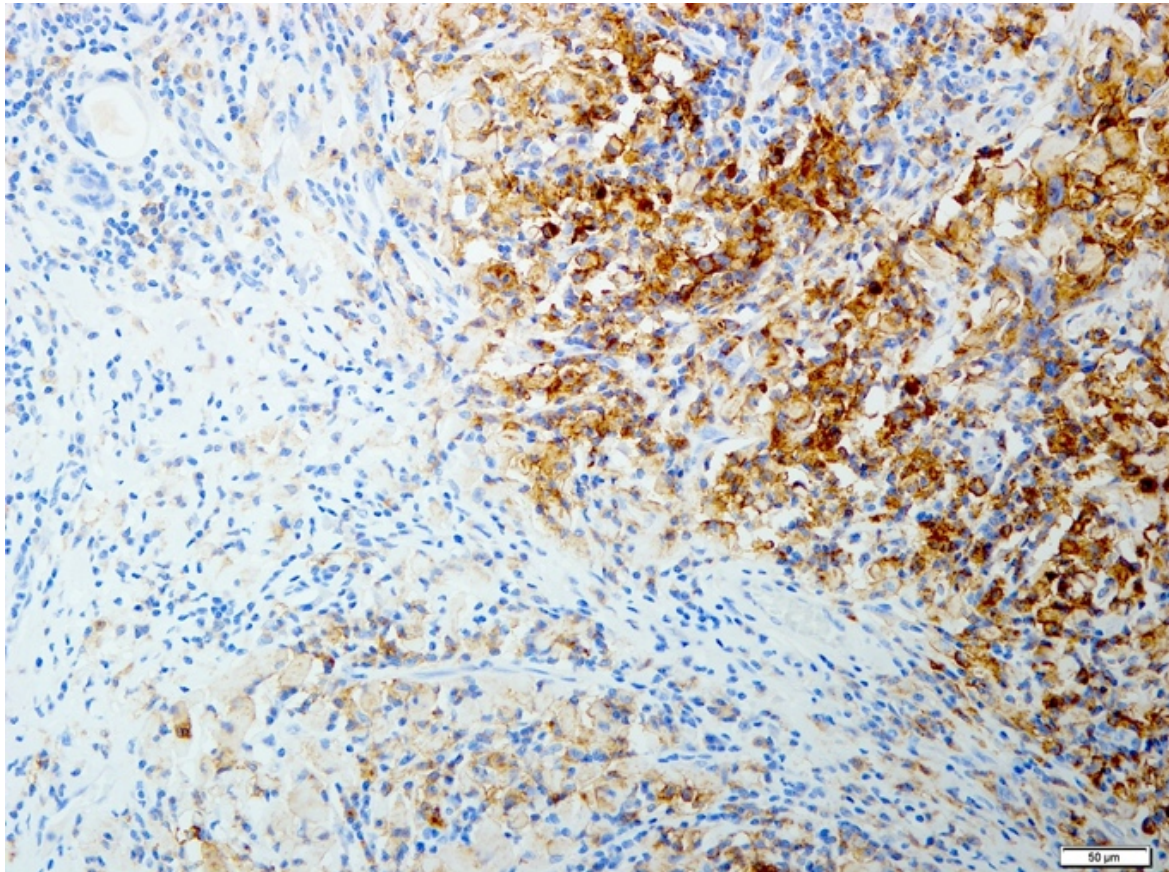


Abb.: 5c

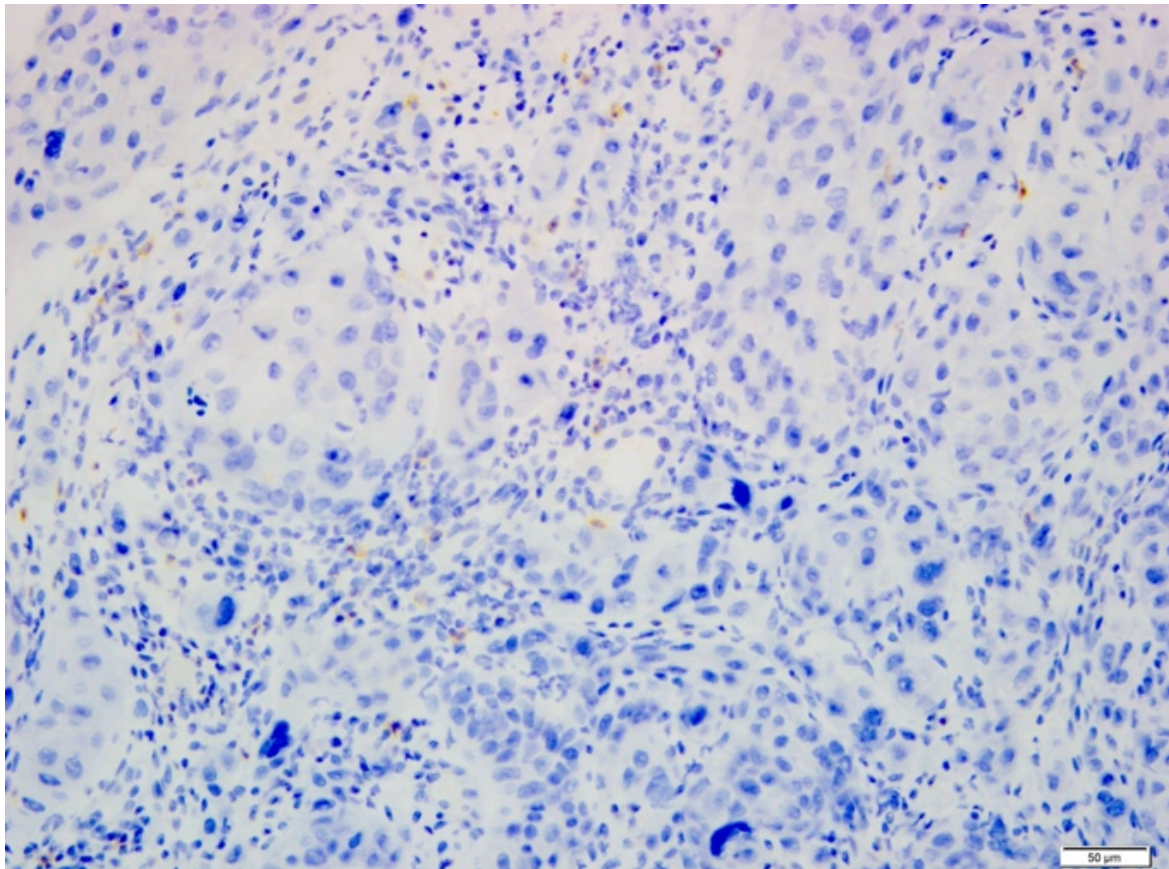


Abb.: 5d

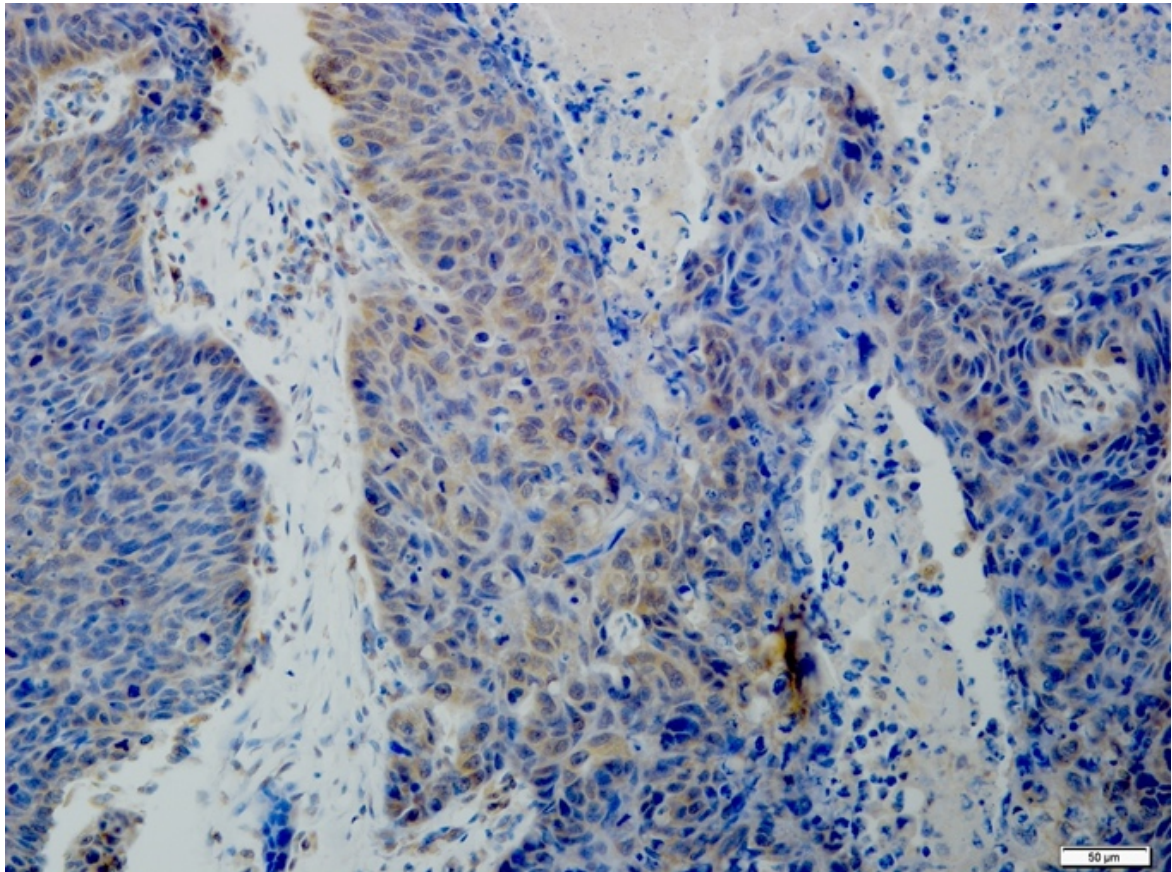


Abb.: 5e

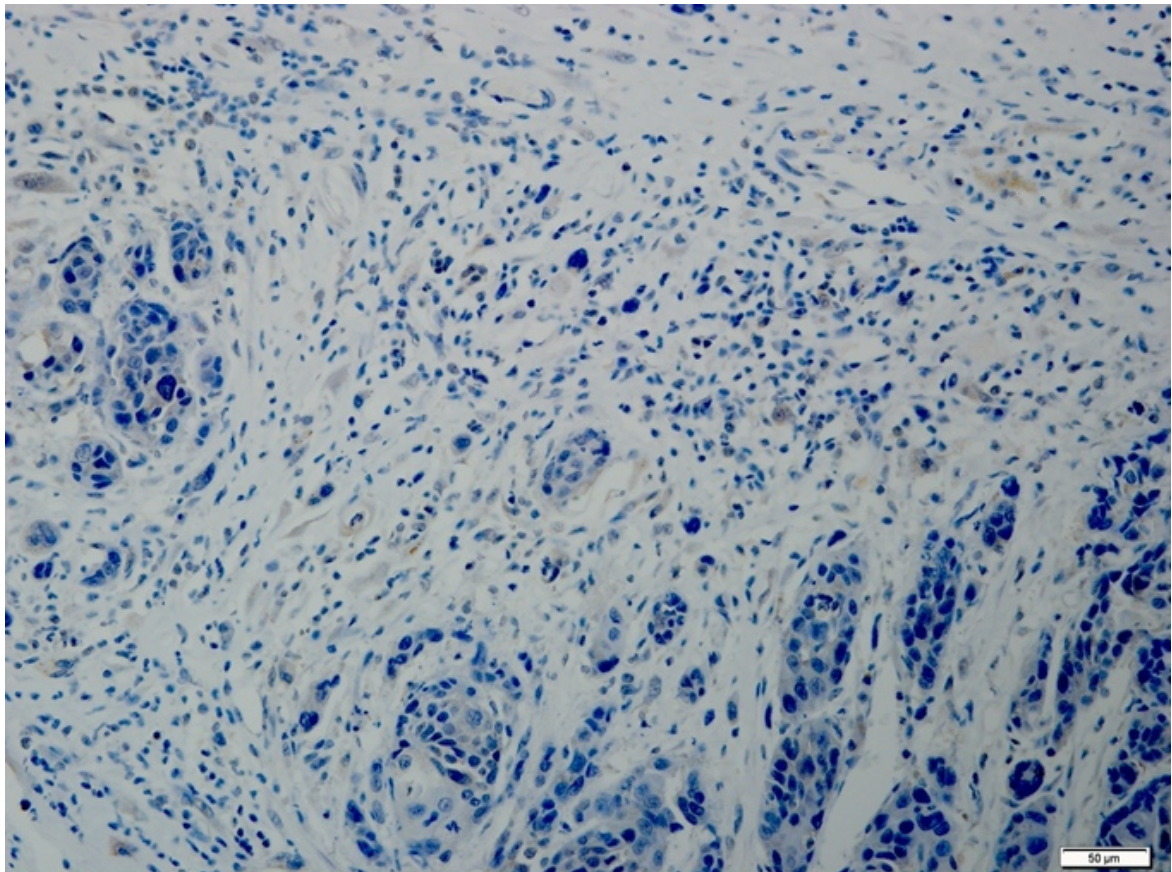


Abb.: 5f

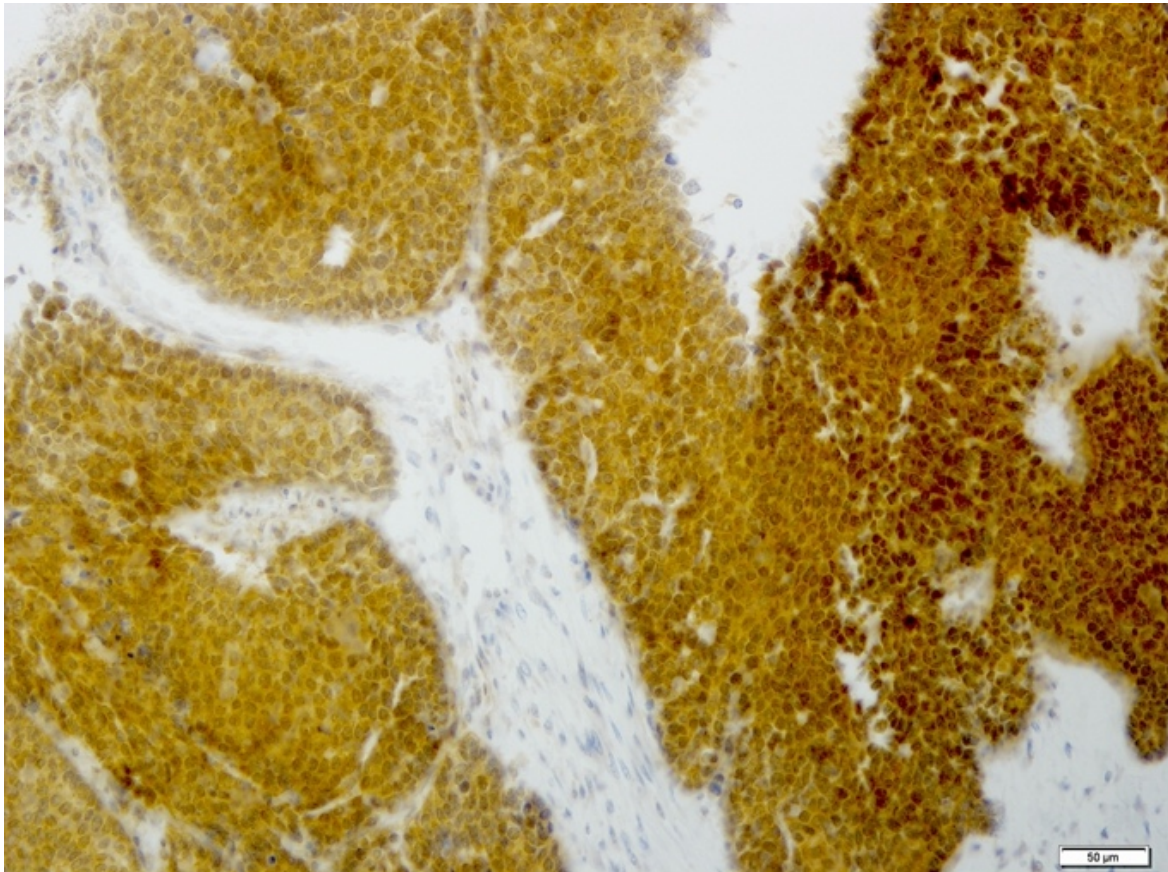


Abb.: 5g

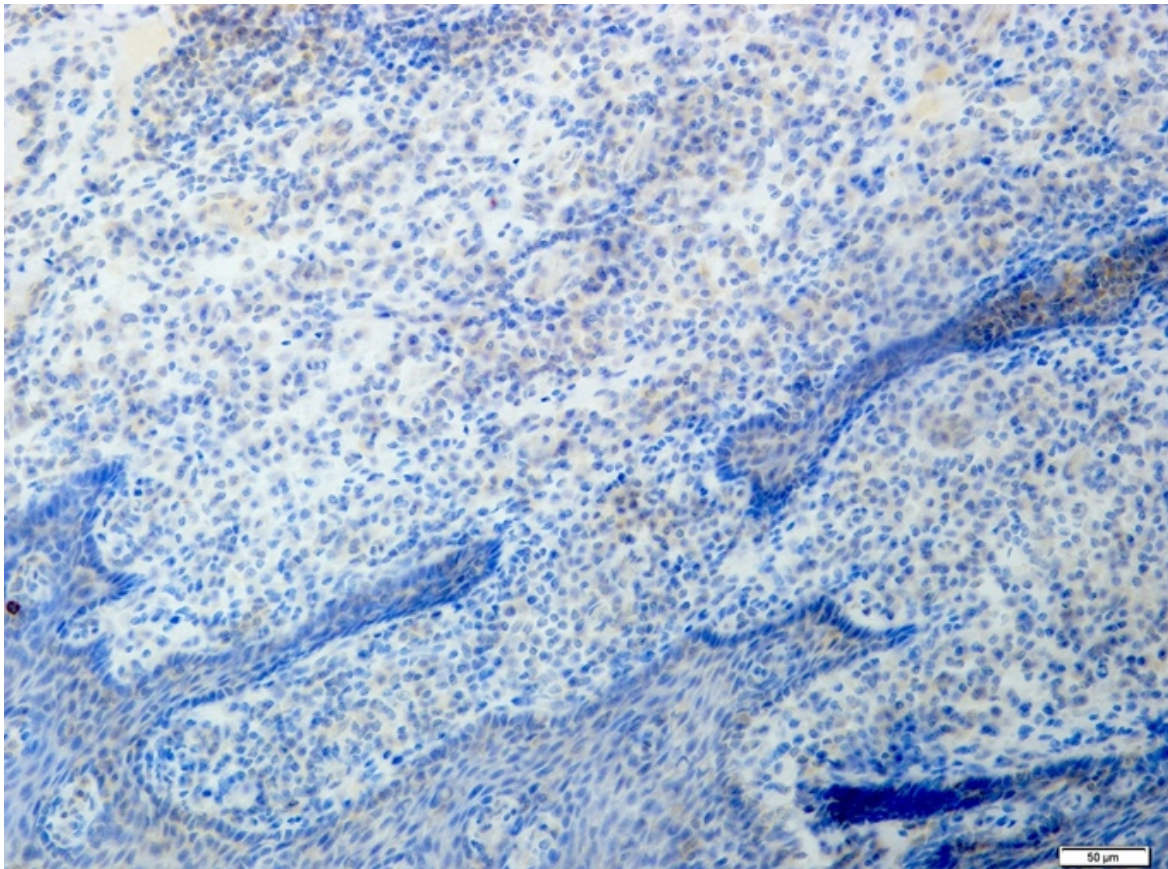


Abb.: 5h

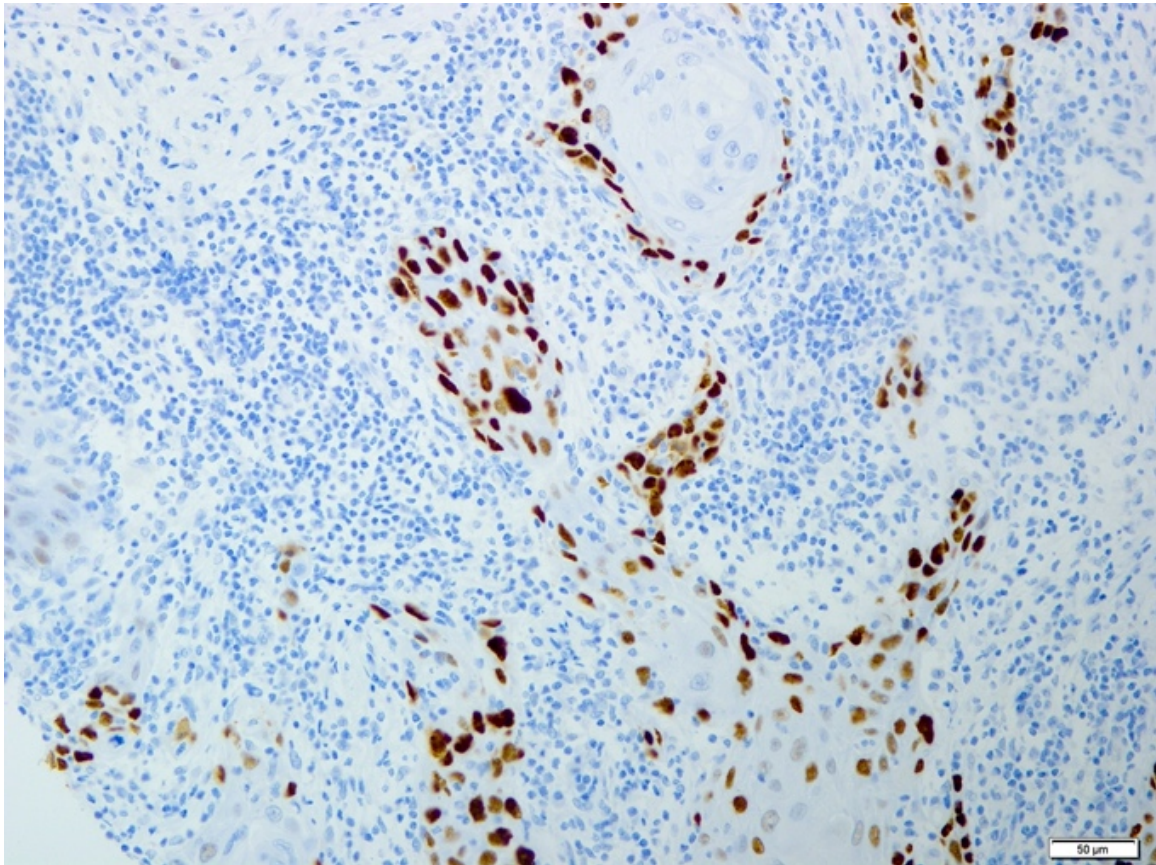


Abb.:5i

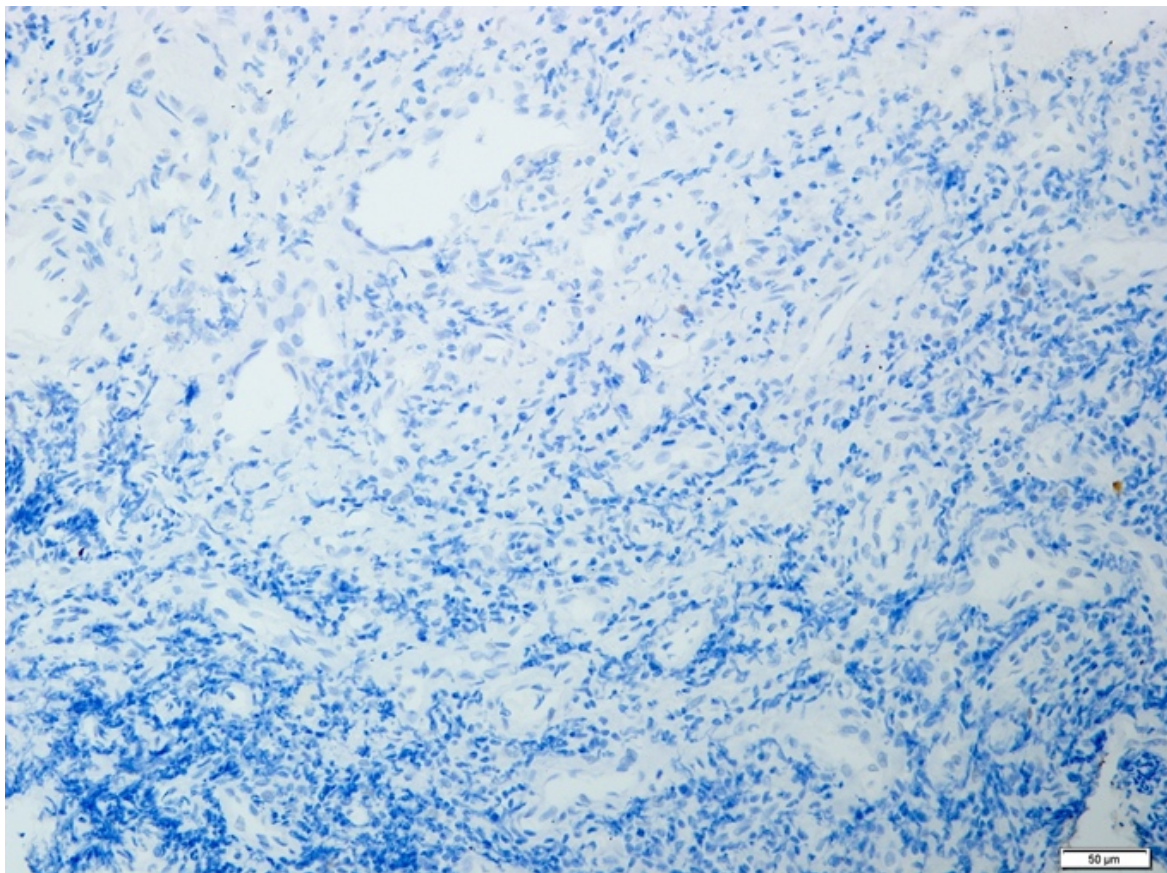


Abb.: 5j

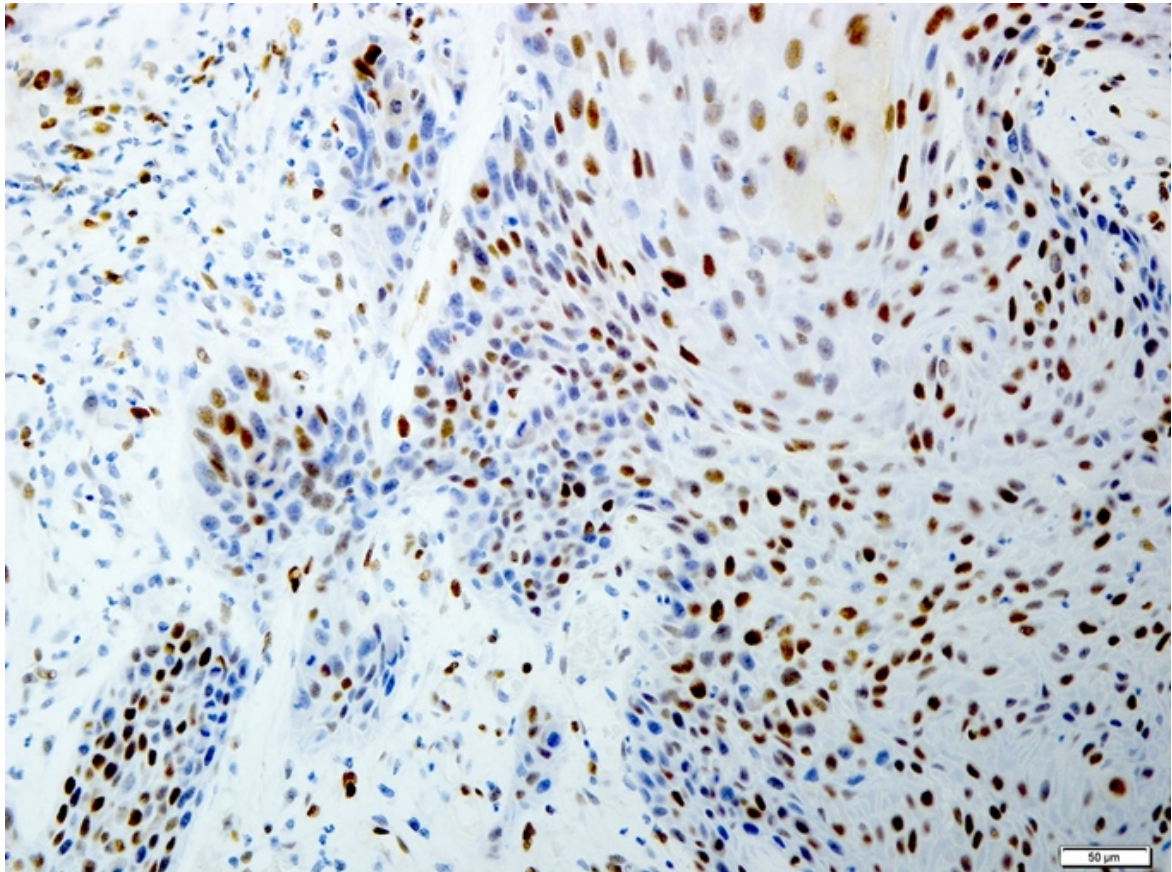


Abb. 5k

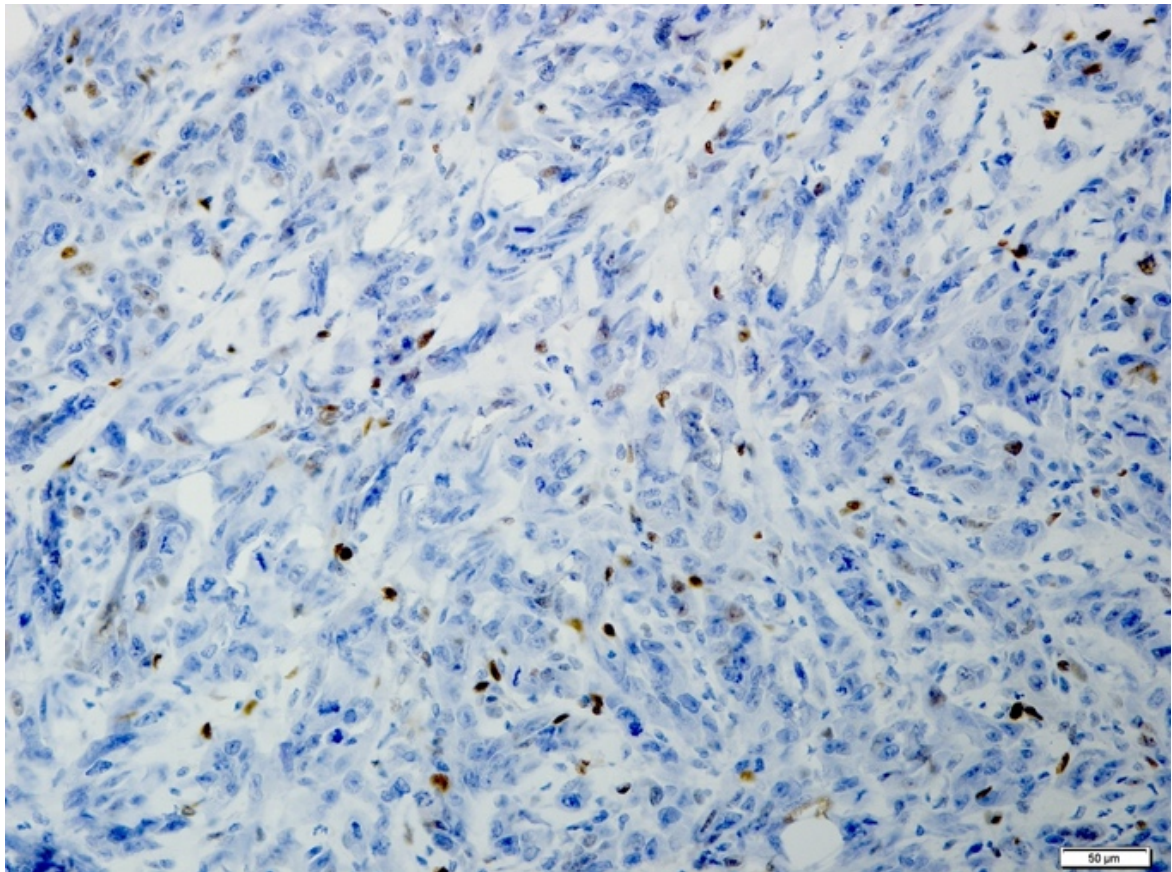


Abb.: 5l

Abbildung 5: Immunhistochemische Färbung mit den projektrelevanten Antikörpern

5a: Immunhistochemische Färbung für den Antikörper CMTM6 mit einem CMTM6-CPS ≥ 10 (CMTM6 *high*)

5b: Immunhistochemische Färbung für den Antikörper CMTM6 mit einem CMTM6-CPS < 10 (CMTM6 *low*)

5c: Immunhistochemische Färbung für den Antikörper PD-L1 mit einem PD-L1-CPS ≥ 1 (PD-L1 positiv)

5d: Immunhistochemische Färbung für den Antikörper PD-L1 mit einem PD-L1-CPS < 1 (PD-L1 negativ)

5e: Immunhistochemische Färbung für den Antikörper AKT mit einem semi-quantitativen Score (IRS) von 3 (schwache Färbung bei mehr als 50 % der Tumorzellen)

5f: Immunhistochemische Färbung für den Antikörper AKT mit einem semi-quantitativen Score (IRS) von 0 (keine Färbung vorhanden)

5g: Immunhistochemische Färbung für den Antikörper pAKT mit einem semi-quantitativen Score (IRS) von 6 (Starke Färbung bei mehr als 50 % der Tumorzellen)

5h: Immunhistochemische Färbung für den Antikörper pAKT mit einem semi-quantitativen Score (IRS) von 0 (keine Färbung der Tumorzellen vorhanden)

5i: Immunhistochemische Färbung für den Antikörper p53 mit einer starken Färbereaktion (p53 mutiert)

5j: Immunhistochemische Färbung für den Antikörper p53 mit einer schwachen Färbereaktion (normale Funktion p53)

5k: Immunhistochemische Färbung für den Antikörper p21 mit einem Cut-off ≥ 30 %

5l: Immunhistochemische Färbung für den Antikörper p21 mit einem Cut-off < 30 %

Anmerkung: Die Aufnahmen der immunhistochemischen Färbungen erfolgten mit einer Axiocam 305 color Mikroskopkamera (Carl Zeiss®, Jena, Deutschland) in 20-facher Vergrößerung.

Abkürzungen: CMTM6: *CKLF Like MARVEL Transmembrane Domaine 6*; PD-L1: *Programmed cell death ligand 1*; AKT: *Proteinkinase B*; pAKT: *phosphorylierte Proteinkinase B*; p21: *Tumorsuppressor 21*; p53: *Tumorsuppressor 53*; CPS: *Combined Positive Score*; IRS: *Immune-Reactive-Score*

2.7.6 Statistische Auswertung

Alle klinisch-pathologischen Daten sowie die Parameter der lichtmikroskopischen Auswertung des TMA und der daraus resultierenden Scores wurden für die statistische Auswertung in einer Microsoft® Excel-Tabelle zusammengefasst. Im Anschluss wurden die Daten in das *Statistical Package for Social Science* (SPSS Statistics 29) von IBM® überführt.

Dichotome Zusammenhänge wurden mittels Kontingenzanalysen ermittelt und mit dem Fisher-Exakt-Test zwecks möglicher Signifikanzen hinsichtlich der Unterschiede zwischen den Gruppen überprüft. Bei mehr als zwei Ausprägungsmustern kam der Chi-Quadrat-Test zum Einsatz, um die entsprechenden Parameter auf signifikante Verteilungszusammenhänge zu testen und darzustellen. Korrelationsanalysen erfolgten mit dem Rho-Spearman-Test.

Die Überlebenswahrscheinlichkeiten wurden mit Hilfe der Kaplan-Meier-Methode berechnet, die univariable Überlebenszeitanalyse erfolgte mittels dem log-rank-Test.

Anhand verschiedener Subgruppenanalysen (Alter, Geschlecht, HPV-Assoziation, Platin-Behandlung, PD-L1-Expression, AKT und pAKT-Expression) wurde der Einfluss von CMTM6 und PD-L1 hinsichtlich eines verlängerten Gesamt- und progressionsfreien Überlebens analysiert.

Das statistische Signifikanzniveau wurde auf $p < 0,05$ festgesetzt.

Zur Ermittlung des Cut-off-Wertes für die Antikörper CMTM6, AKT und pAKT wurden umfangreiche *receiver operating characteristic* Analysen (ROC-Analyse) durchgeführt. Bei diesem Verfahren wird der Wert ermittelt, der die höchste Sensitivität und Spezifität für eine Stichprobe liefert (Hajian-Tilaki, 2013).

3 Ergebnisse

3.1 Analyse des Kollektivs

Insgesamt wurden 151 Primärtumore in das Kollektiv für die retrospektiv angelegte Studie eingeschlossen. Der Beobachtungszeitraum umfasste die Zeitspanne ausgehend vom Datum der Erstdiagnose bis hin zum Sterbedatum, oder der letzten Vorstellung an der UMR. Vollständig terminiert wurde der Beobachtungszeitraum zum September 2022. Nach Beendigung des Beobachtungszeitraums waren noch 66,9 % ($n = 101$) der Patient:innen am Leben, 33,1 % ($n = 50$) waren verstorben. 42,2 % der Patient:innen ($n = 64$) im Gesamtkollektiv verzeichneten einen Progress in Form eines Rezidivs oder Tod, wohingegen 57,6 % Patient:innen ($n = 87$) progressionsfrei blieben. Als progressionsfreies Überleben wurde das Ausbleiben von Metastasen, Rezidiven oder Eintreten eines Todesereignisses definiert.

3.1.1 Alters- und Geschlechtsverteilung

Das Kollektiv setzte sich aus 120 Männern (79,5 %) und 31 Frauen (20,5 %) zusammen. Somit weist das Kollektiv eine Geschlechterverteilung von 5:1 auf, wobei Männer den höheren Anteil darstellen. Bei Männern im Gesamtkollektiv betrug bei Diagnosestellung das mittlere Alter 67,39 Jahre (Spannweite: 43 - 95 Jahre) und das mittlere Erkrankungsalter 67,8 Jahre. Bei Frauen betrug das mittlere Erkrankungsalter 67,3 Jahre. Insgesamt waren im Gesamtkollektiv 19,2 % ($n = 29$) unter und 80,8 % ($n = 122$) über 60 Jahren.

3.1.2 Tumorlokalisation

Die für diese Arbeit in Frage kommenden Plattenepithelkarzinome umfassen die anatomisch definierten Bereiche des HNSCC (*Abbildung 1*). Dabei wurden die Subbereiche folgendermaßen zusammengefasst:

- a. Mundhöhle: äußere Lippe ($n = 1$), Zungengrund ($n = 5$), Zungenrand ($n = 17$), ventrale Oberfläche der Zunge ($n = 1$), Zungentonsille ($n = 1$), Zunge ($n = 1$), Oberkieferzahnfleisch ($n = 5$), Unterkieferzahnfleisch ($n = 6$), Mundboden ($n = 11$), Gaumen ($n = 5$) und nicht weiter bezeichnete Bereiche des Mundes ($n = 3$).
- b. Oropharynx: die Tonsillen ($n = 31$), Teilbereiche des Oropharynx ($n = 5$).

- c. Hypopharynx: Sinus piriformes ($n = 4$), weitere verschiedenen Bereiche des Hypopharynx ($n = 9$).
- d. Larynx: die Glottis ($n = 21$), Supraglottis ($n = 10$), Subglottis ($n = 2$), weitere Teile des Larynx ($n = 1$)

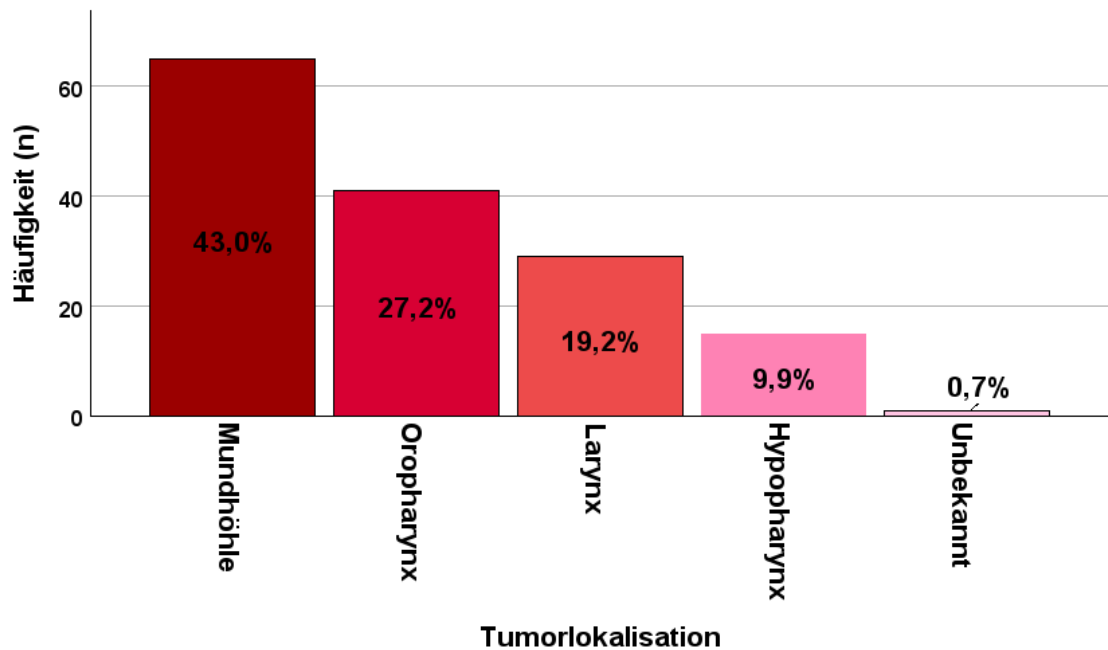


Abbildung 6: Häufigkeitsverteilung der Tumorlokalisation im Gesamtkollektiv

3.1.3 Tumorklassifikation

Das Patient:innenkollektiv wurde anhand der TNM-Klassifikation in die entsprechenden Stadien eingeteilt. Gemäß der 8. Auflage des TNM UICC wurde der HPV-Status ebenfalls in der Eingruppierung der einzelnen HPV-positiven Tumore berücksichtigt.

In Zusammenschau aller vorliegenden klinisch-pathologischen Parameter zum Zeitpunkt der Erstdiagnose, resultierte die im Folgenden zu sehende Zusammensetzung des Kollektivs (Tabelle 5):

Tabelle 5: Zusammenfassung der klinisch-pathologischen Parameter des Gesamtkollektivs bei Erstdiagnose

Stadium	Häufigkeit (n)	Prozentualer Anteil (%)
T-Stadium		
T1	38	25,5
T2	43	28,5

Stadium	Häufigkeit (n)	Prozentualer Anteil (%)
T3	27	17,9
T4	43	28,5
N-Stadium		
N0	58	38,7
N1	23	15,3
N2	56	37,3
N3	13	8,7
M-Stadium		
M0	148	98
M1	1	0,7
Mx (unbekannt)	2	1,3
Grading (p16-negativ)		
G1 – gut differenziert	10	6,6
G2 - mäßig differenziert	77	51,0
G3 - schlecht differenziert	24	15,9
G4 - undifferenziert	0	0
Unbekannt	2	1,3
HPV-Status		
p16-postiv	38	25,2
Lymphgefäßinvasion		
Ja	25	16,6
Nein	90	59,6
Unbekannt	36	23,8
Veneninvasion		
Ja	4	2,6
Nein	115	73,5
Unbekannt	36	23,8
Perineurale Invasion		
Ja	19	12,6
Nein	82	54,3
Unbekannt	50	33,1

Abkürzungen: T: Tumor; N: Nodal; M: Metastasen; G: Differenzierungsgrad (Grading); HPV: Humanes-Papilloma Virus; p16: *Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 2A*

Um aufgrund der geringen Kollektivgröße eine bessere Vergleichbarkeit herzustellen, wurden die aus dem TNM resultierenden UICC-Stadien I und II (Nodal-negativ) sowie III und IV (Nodal-positiv) zu Subgruppen zusammengeführt und so in die weiteren Analysen mit eingebracht (*Abbildung 7*).

In diesem Kollektiv hatten Patient:innen mit einem UICC-Stadium III oder IV eine höhere Progressionsrate, welcher in dieser Arbeit als Rezidiv oder Tod definiert wurde, als Patient:innen in niedrigeren Stadien (exakter Test nach Fisher: $p = 0,07$). Patient:innen mit Tumoren im UICC-Stadium III und IV zeigten mittels immunhistochemischer Färbung eine gehäufte *TP53* Aberration im Vergleich zu Patient:innen im Stadium I und II (exakter Test nach Fisher: $p < 0,01$).

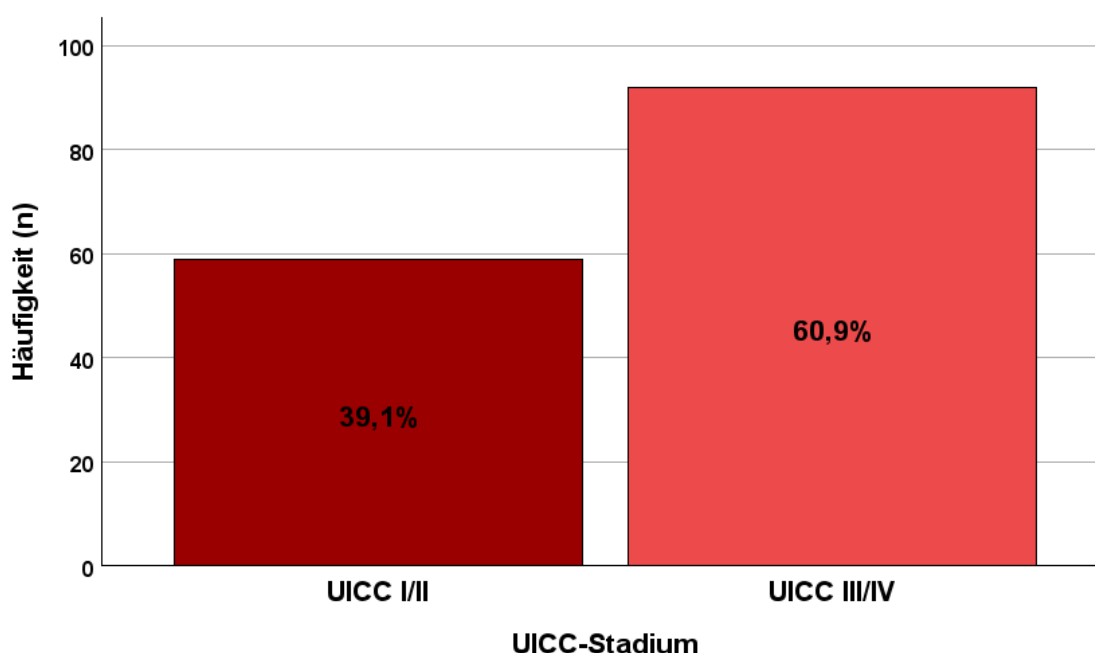


Abbildung 7: Häufigkeitsverteilung der UICC-Stadien im Gesamtkollektiv

Abkürzungen: UICC: *Union for International Cancer Control*

3.1.4 Noxen-assoziierte Karzinome

Zum Zeitpunkt der Diagnosestellung ergab sich eine Verteilung von 60 Rauchern (39,7 %) zu 91 Nicht-Rauchern (60,3 %, (*Abbildung 8a*)).

Die Mehrzahl der Patient:innen gab mit einer Häufigkeit von 115 Fällen (76,2 %) an, keinen Alkohol konsumiert zu haben (*Abbildung 8b*). Die Fälle, bei denen keine eindeutig positive Alkoholanamnese erhoben werden konnte, wurden der nicht alkoholkonsumierenden Kohorte zugeordnet. 36 Patient:innen (23,8 %) des Gesamtkollektivs wiesen eine positive Alkoholanamnese auf.

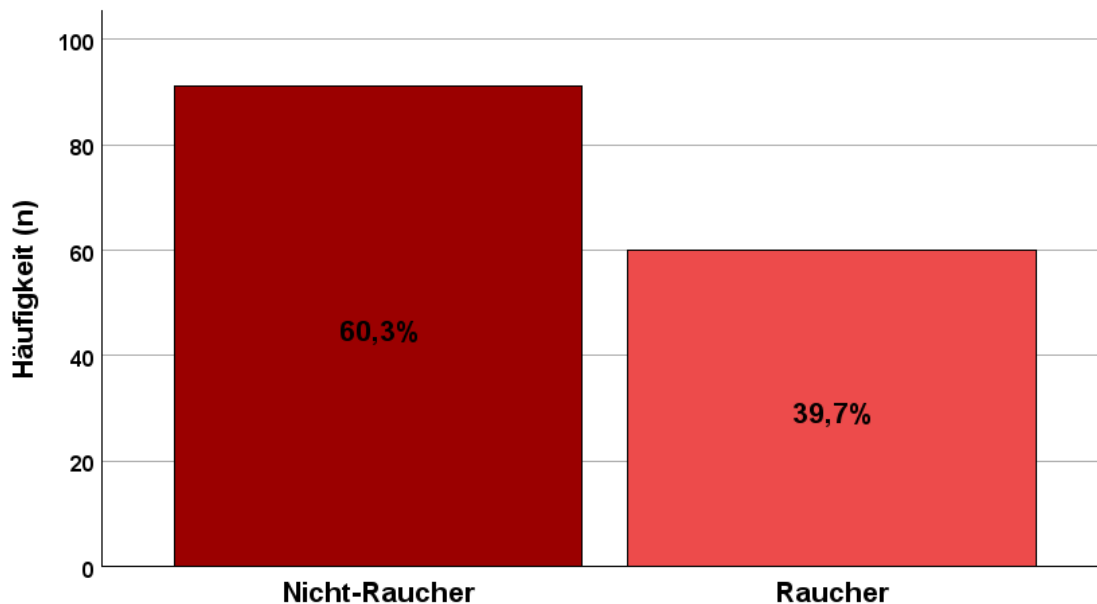


Abb.: 8a

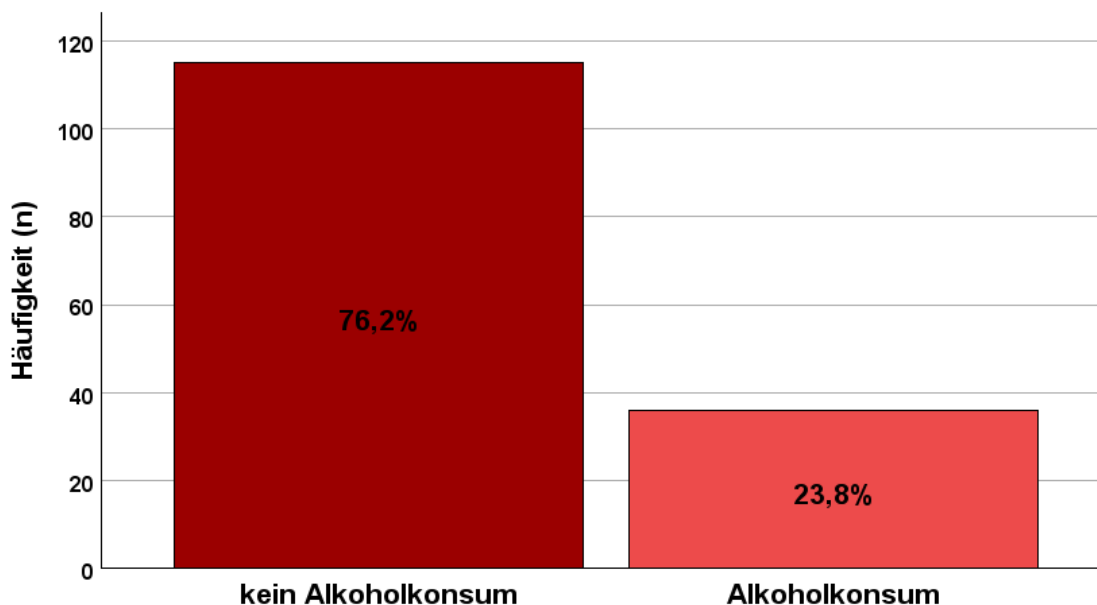


Abb.: 8b

Abbildung 8: Häufigkeitsverteilung der Noxenanamnese

Abb.: 8a: Häufigkeitsverteilung von Rauchern zu Nicht-Rauchern im Gesamtkollektiv;

Abb.: 8b: Häufigkeit der alkoholkonsumierenden zu nicht- alkoholkonsumierenden Patient:innen des Gesamtkollektivs

3.1.5 HPV-assoziierte Karzinome

Definitionsgemäß gilt ein positiver p16 Status als Surrogatmarker für eine HPV-Infektion. Präparate von Patient:innen mit einem positiven Nachweis für p16 wurden anschließend molekulargenetisch auf einen der HPV *high-risk* Subtypen getestet. Im Folgenden gingen diese Patient:innen als HPV-positive Fälle in die Analyse mit ein. Alle anderen Fälle wurden der HPV-negativen Subgruppe zugeordnet.

Molekulargenetisch konnte bei 39 Patient:innen (25,2 %) ein positiver oropharyngealer HPV-Status nachgewiesen werden (*Abbildung 9a*). Dabei handelte es sich vor allem um die *high-risk* Subtypen 16, 28, 33 und 35 (*Abbildung 9b*).

112 Patient:innen (74,8 %) wiesen einen negativen HPV-Status auf. In dieser Subgruppe sind auch diejenigen Patient:innen mit nicht getesteter Genetik inkludiert.

Anhand der Typenanalyse ergab sich folgende Subtypenreihenfolge der p16 positiven Fälle: HPV16: 50,0 % ($n = 19$), HPV33: 7,9 % ($n = 5$) und die Subtypen HPV26 und 35 mit jeweils 2,6 % ($n = 1$). Insgesamt 12 (31,5 %) der Fälle konnten bei positivem p16 Status aufgrund einer zu schlechten DNA-Qualität keinem eindeutigen HPV-Subtyp zugeordnet werden.

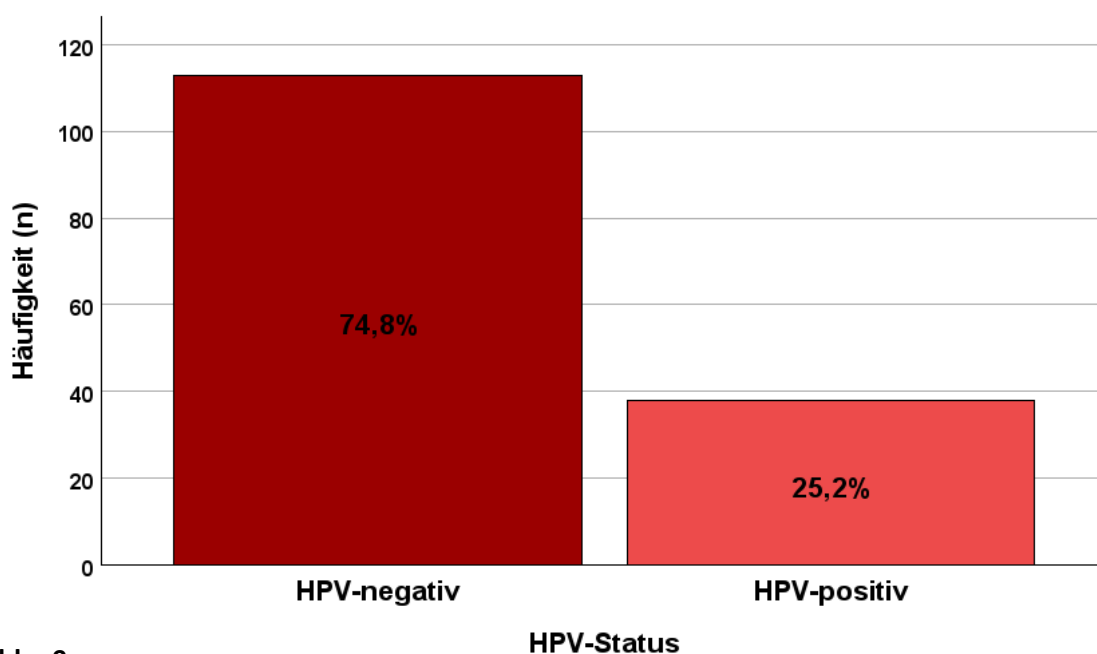


Abb.: 9a

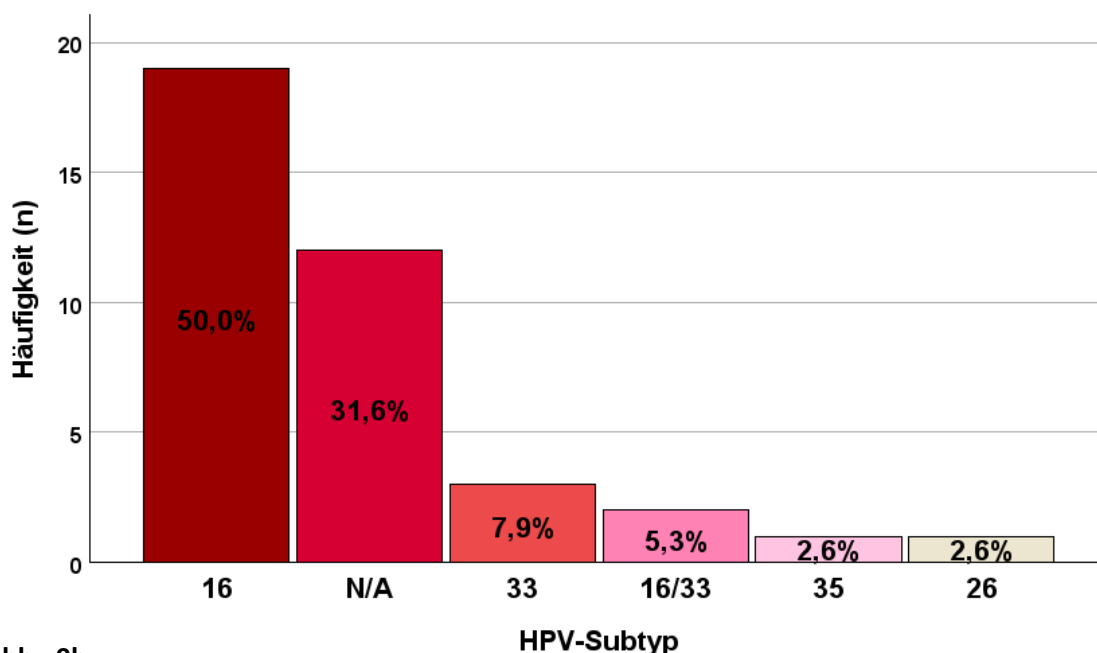


Abb.: 9b

Abbildung 9: Häufigkeitsverteilung in Abhängigkeit des HPV-Status

Abb.: 9a: Häufigkeitsverteilung in Abhängigkeit des HPV-Status im Gesamtkollektiv. Patient:innen mit positivem p16-Status und molekulargenetischer HPV-Subtypanalyse wurden der Subgruppe HPV-positiv zugeordnet. Patient:innen mit negativem p16-Status wurden der Subgruppe HPV-negativ zugeordnet.

Abb.: 9b: Häufigkeitsverteilung der molekulargenetisch identifizierten *high-risk* HPV-Subtypen.

Abkürzungen: n: Anzahl; HPV: Humanes-Papilloma Virus; N/A: not available

Die Analysen zeigten einen statistisch signifikanten Zusammenhang zwischen einem positiven HPV-Nachweis und der Lokalisation des Karzinoms in einer der typischen anatomischen Regionen des HNSCC (Pearson-Chi-Quadrat: $p = 0,001$) (Abbildung 10). Häufigkeitsanalysen zeigten ein typisches Verteilungsmuster der HPV-positiven Tumore in den entsprechenden anatomischen Regionen des HNSCC.

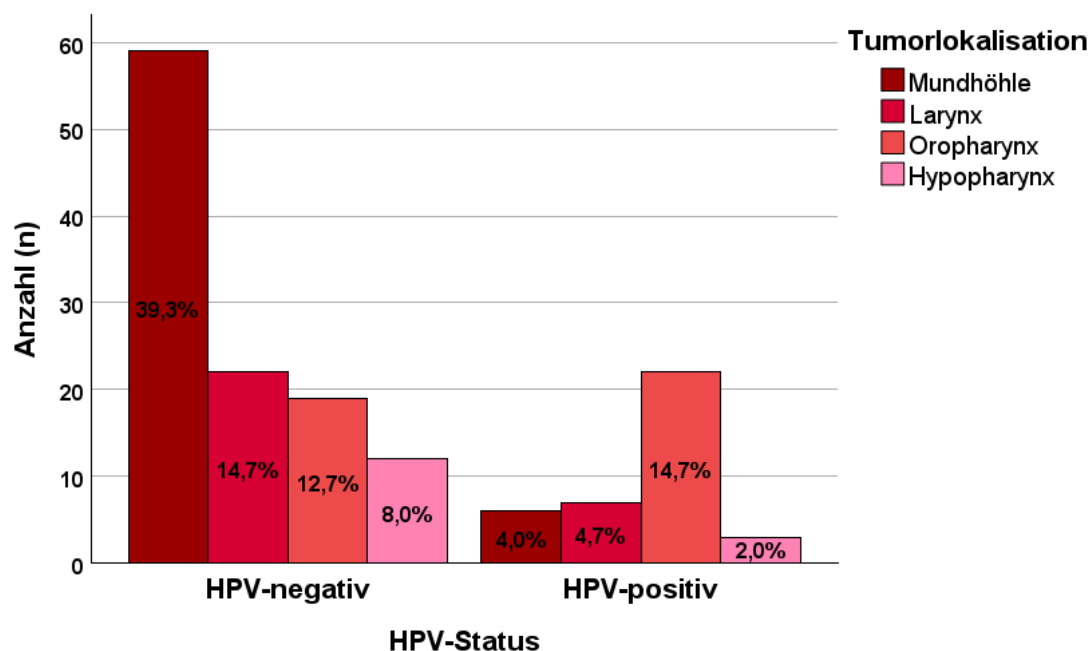


Abbildung 10: Häufigkeitsverteilung in Abhängigkeit des HPV-Status und Tumorlokalisation im Gesamtkollektiv

Patient:innen mit positivem p16-Status und molekulargenetischer Subtypanalyse wurden der HPV-positiven Subgruppe zugeteilt. Patient:innen mit negativem p16-Status wurden der Subgruppe HPV-negativ zugeteilt. Anhand dieser Einteilung wurden das Vorkommen von HPV-positiven Tumoren in den typischen anatomischen Regionen des HNSCC analysiert.

Abkürzungen: *n*: Anzahl; HPV: Humanes-Papilloma Virus; HNSCC: *Head and Neck Squamosa Cell Carcinoma*

3.1.6 Therapie

Gemäß der leitliniengerechten Therapie erhielten die Patient:innen in unserem Kollektiv in 43,7 % ($n = 66$) eine adjuvante platinhaltige Chemotherapie, in 18,5 % ($n = 28$) eine adjuvante Radiotherapie und in 8,6 % ($n = 13$) eine kombinierte platinhaltige Radio-Chemotherapie (*Abbildung 11*). Im Falle von fortgeschrittenen, metastasierten und prognostisch günstigen positiven PD-L1 CPS (Cut-off ≥ 1 %) als Entscheidungsparameter erhielten die Patient:innen eine Kombination aus platinhaltigen Chemotherapeutika und Immun-Checkpoint-Inhibitoren (4,0 %; $n = 6$), Immun-Checkpoint-Inhibitoren und Radiotherapie (4,0 %; $n = 6$) oder alleinige Immun-Checkpoint-Inhibitoren (4,6 %; $n = 7$). Patient:innen mit einer zu hohen Nebenwirkungsrate, schlechtem klinischen Allgemeinzustand oder fortgeschrittener Niereninsuffizienz konnten keiner weiteren adjuvanten Therapie zugeführt werden (14,7 %; $n = 22$). In Einzelfällen, wie in *Abbildung 11* zu sehen, wurden personalisierte Therapieoptionen

gewählt. Die Entscheidung für den Einsatz dieser Therapieform beruhte auf Patient:innen-Wunsch oder wurde im Rahmen von Studien festgelegt.

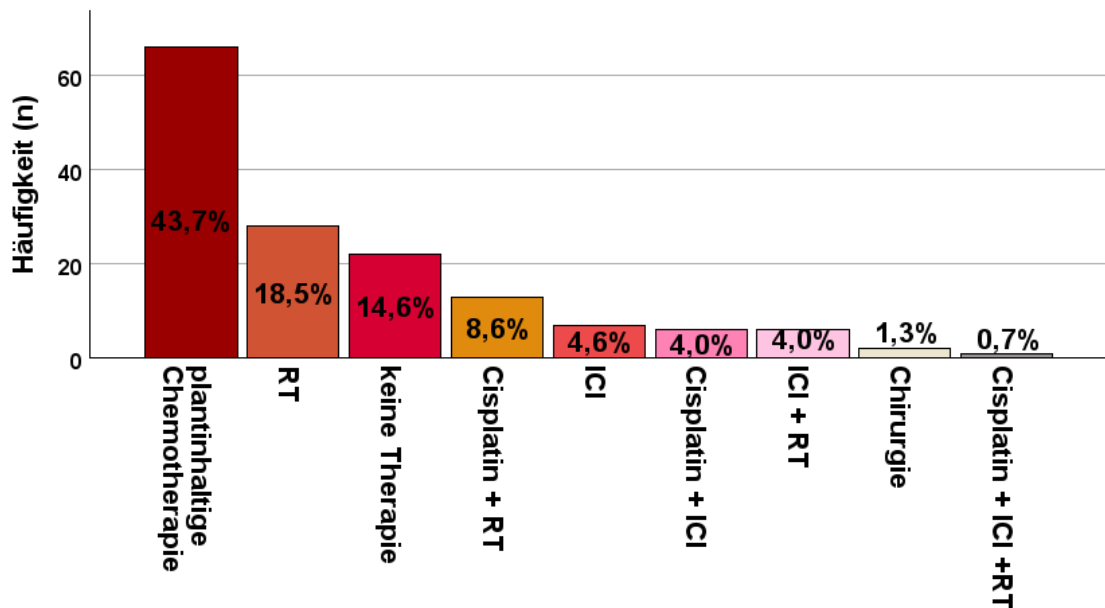


Abbildung 11: Häufigkeitsverteilung der angewendeten Therapieverfahren im Gesamtkollektiv

Die platinhaltige Chemotherapie umfasst Cisplatin und Carboplatin. Bei den angewandten ICI handelt es sich um Cetuximab, Denosumab, Nivolumab oder Pembrolizumab.

Abkürzungen: n: Anzahl; RT: Radiotherapie; ICI: Immun-Checkpoint-Inhibitoren

Patient:innen, welche eine Platin-basierte Therapie erhielten, wiesen im Vergleich zu Patient:innen ohne entsprechende adjuvante Therapie, gehäuft ein UICC-Stadium III oder IV auf (exakter Test nach Fisher: $p = 0,03$).

In Tabelle 6 sind alle klinisch-pathologischen Daten des Gesamtkollektivs zusammengefasst.

Tabelle 6: Zusammenfassung der klinisch-pathologischen Daten im Gesamtkollektiv

Charakteristika		Anzahl (n)	Prozentualer Anteil (n = 151)
Geschlecht	Weiblich	31	79,5 %
	Männlich	120	20,5 %
Alter (Jahre)	Mittelwert	67,39	
	Spannweite	43 - 95	
	Mittleres Erkrankungsalter (m)	67,8	
	Mittleres Erkrankungsalter (w)	67,3	
	>60	122	80,8 %
	<60	29	19,2 %

Charakteristika	Anzahl (n)	Prozentualer Anteil (n = 151)
Noxen	Alkoholkonsum	115
	Kein Alkoholkonsum	36
	Raucher	60
	Nicht-Raucher	91
Lokalisation	Mundhöhle	65
	Oropharynx	41
	Larynx	29
	Hypopharynx	15
	Unbekannt	1
UICC-Stadium	I und II	59
	III und IV	92
HPV-Status	p16-postiv	39
	p16-negativ	112
Therapie (adjuvant)	platinhaltige Chemotherapie	66
	Radiotherapie	28
	ICI	7
	Kombinationstherapie	50
Progress	Rezidiv/ Tod	64
	Kein Progress	87

Abkürzungen: m: männlich; w: weiblich; UICC: *Union for International Cancer Control*; HPV: *Humanes Papilloma Virus*; p16: *Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 2A*; ICI: *Immune-Checkpoint-Inhibitor*

3.2 CKLF Like MARVEL Transmembrane Domaine 6 Expression

Gemäß der ROC-Analyse wurde der Cut-off für den CMTM6-CPS bei 10 gesetzt (Becker et al., 2024). Somit konnte das Kollektiv hinsichtlich der CMTM6-Expression in die Subgruppen „CMTM6-low“ (CMTM6-CPS <10) und „CMTM6-high“ (CMTM6-CPS ≥10), wie in Tabelle 7 gezeigt, unterteilt werden.

Anhand dieser Subgruppeneinteilung weist das Kollektiv 104 (68,1 %) Tumorproben mit hoher CMTM6-Expression nach IHC auf. Die mittlere Expression liegt bei 34,47 und der Median bei 25.

Tabelle 7: Häufigkeitsverteilung der CMTM6-Expression

CMTM6-Expression	Häufigkeit (n)	Prozent (%)
CMTM6-CPS <10	47	31,1
CMTM6-CPS ≥10	104	68,1
Gesamt	151	100

Anmerkung: Unterteilung der CMTM6-Expression in die Subgruppen CMTM6-CPS *high* (≥10) und CMTM6-*low* (<10)

Abkürzungen: CMTM6: *CKLF Like MARVEL Transmembrane Domaine 6*; CPS: *Combined Positive Score*

Patient:innen mit einer hohen (CMTM6 ≥10) CMTM6-Expression zeigten häufiger einen aberranten p53-Status (exakter Test nach Fisher: $p = 0,01$); (*data not shown*) auf. Eine gesteigerte CMTM6-Expression (CMTM6 ≥10) ging häufiger mit einer vermehrten PD-L1-Expression (exakter Test nach Fisher: $p < 0,001$) in diesem Kollektiv einher. *Abbildung 12* zeigt die Häufigkeitsverteilung der CMTM6-Expression.

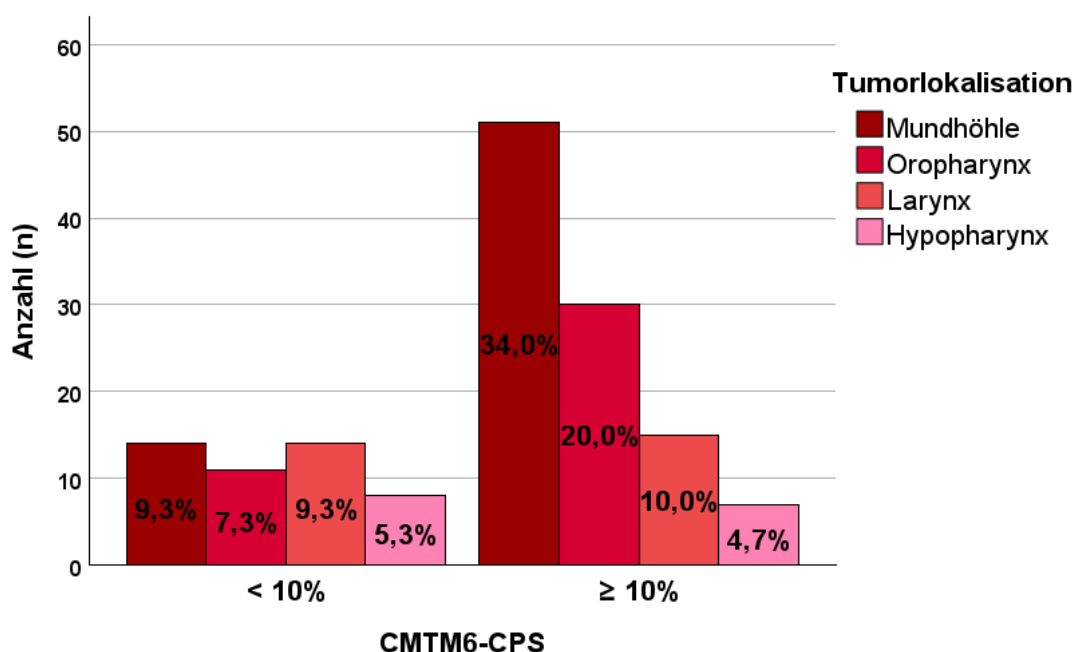


Abbildung 12: Häufigkeitsverteilung von CMTM6 in den anatomischen Regionen des HNSCC

Die Gruppierung erfolgte anhand des CMTM6-CPS in die Gruppen CMTM6 *high* (≥10) und CMTM6 *low* (<10) der jeweiligen HNSCC typischen anatomischen Region.

Abkürzungen: CMTM6: *CKLF Like MARVEL Transmembrane Domaine 6*; HNSCC: *Head and Neck Squamous Cell Carcinoma*; CPS: *Combined Positive Score*.

Sie wurde in CMTM6 *high* (≥ 10) und CMTM6 *low* (< 10) in den anatomischen Regionen des HNSCC kategorisiert. Ein statistisch signifikanter Zusammenhang lässt sich zwischen einer hohen CMTM6-Expression und der Region der Mundhöhle nachweisen (Pearson-Chi-Quadrat: $p = 0,026$).

Die Analysen zeigen eine statistisch signifikante Korrelation von CMTM6 mit PD-L1 (Spearman-Rho $r = 0,26$; $p = 0,001$), dem AKT-Produkt (Spearman-Rho $r = 0,244$; $p = 0,01$) und dem pAKT-Produkt (Spearman-Rho: $r = 0,22$; $p = 0,01$).

3.3 *Programmed Cell Death Ligand 1* Expression

Wie in der Literatur beschrieben und in den diagnostischen Leitlinien empfohlen, wurde auch in dieser Arbeit ein Cut-off von ≥ 1 für den PD-L1-CPS definiert (Evrard et al., 2020). Somit konnte das Gesamtkollektiv in die Kohorten mit positivem PD-L1-CPS (PD-L1 ≥ 1) und negativem PD-L1-CPS (< 1) unterteilt werden.

Neoplasien in diesem Kollektiv mit einem PD-L1-CPS von ≥ 1 hatten ein statistisch signifikant gehäuftes Auftreten eines Progresses in Form von Tod oder eines Rezidivs (exakter Test nach Fisher: $p = 0,006$). 71 (47,2 %) Patient:innen mit einem PD-L1-CPS von ≥ 1 wiesen einen Progress auf, wohingegen 39 (28,83 %) Patient:innen keinen Progress erlitten.

Zudem zeigten sich statistisch signifikante Zusammenhänge zwischen einem positiven PD-L1-CPS Status und einer hohen CMTM6-CPS (≥ 10) (exakter Test nach Fisher: $p < 0,001$). Insgesamt 85 Tumore (56,2 %) mit einem PD-L1-CPS von ≥ 1 wiesen einen CMTM6-CPS von ≥ 10 auf. Diese Beobachtung zeigte sich ebenfalls in Korrelationsanalysen nach Spearman-Rho ($r = 0,25$; $p < 0,001$).

3.4 Proteinkinase B (AKT)-Expression

Aufgrund von fehlendem oder nicht ausreichend erfasstem Tumorgewebe auf dem TMA, konnten 40 Fälle (26,5 %) des gesamten Kollektivs ($n = 151$) nicht mit in die Analyse eingeschlossen werden. Diese wurden von weiteren statistischen Berechnungen ausgeschlossen.

Die AKT-Expression wurde in einem semi-quantitativen Produktscore ausgewertet.

Für die Anfärbbarkeit (Tabelle 8) und den prozentualen Anteil der anfärbbaren Zellen mit dem Antikörper für AKT (Tabelle 9) ergab sich folgende Ausprägung für die 111 (= 100 %) gültigen Tumorproben.

Tabelle 8: Häufigkeitsverteilung des Färbeverhaltens für den Antikörper AKT

Färbeverhalten	Häufigkeiten (n)	Prozent (%)	Score
Starke Färbung	31	27,9	2
Schwache Färbung	57	79,3	1
Keine Färbung	23	20,7	0
Gesamt	111	100	-

Anmerkung: Das Färbeverhalten lässt sich in die Kategorien „starke Färbung - schwache Färbung - keine Färbung“ einteilen. Die entsprechende Kategorie ist mit einem Score-Wert verknüpft.

Tabelle 9: Häufigkeitsverteilung des prozentualen Anteils der gefärbten Zellen für den Antikörper AKT

Prozentualer Anteil der Zellen	Häufigkeit (n)	Prozent (%)	Score
>50 % der Zellen	45	40,5	3
20-50 % der Zellen	24	21,6	2
1-20 % der Zellen	19	17,1	1
< 1 % der Zellen	23	20,70	0
Gesamt	111	100	-

Anmerkung: Bewertet wurde der prozentuale Anteil der anfärbbaren Zellen und wurde in die entsprechenden Kategorien eingeteilt. Die Kategorien wurden mit einem Score-Wert verknüpft.

Die Verteilung gemäß des semi-quantitativen Scores lässt sich aus der nachfolgenden Tabelle entnehmen (Tabelle 10):

Tabelle 10: Häufigkeitsverteilung für den semi-quantitativen Produktscore (IRS) für den Antikörper AKT

Produktscore	6	4	3	2	1	0	Gesamt
Häufigkeit (n)	25	4	20	22	17	23	111
Prozent (%)	22,5	3,6	18,0	19,8	15,3	20,7	100

Anmerkung: Anhand der Scores für das Färbeverhalten und dem prozentualen Anteil der gefärbten Zellen wurde der semi-quantitative Produktscore für AKT berechnet.

Der Cut-off für die maximale Sensitivität dieser Färbung wurde nach entsprechenden ROC-Analysen auf einen Score von ≥ 5 gesetzt. Alle Tumorproben mit einem Score von ≥ 5 wurden als

positiv gewertet. Positiv kategorisierte Tumore wiesen eine vermehrte Expression und Aktivität für das Protein AKT sowie deren nachgeschalteten Signalachsen auf.

Anhand des Rangkorrelationskoeffizienten nach Spearman (r) für ordinal skalierte Werte zeigten sich statistisch signifikante Korrelationen für den AKT-Produktscore mit dem CMTM6- CPS ($r = 0,244$; $p = 0,01$) sowie für den AKT-Produktscore mit dem pAKT-Produktscore ($r = 0,262$; $p = 0,007$).

3.5 Phosphorylierte Proteinkinase B (p-AKT)-Expression

Die gleiche Analyse wie für AKT wurde für den Biomarker pAKT durchgeführt. Im Falle von pAKT wurden 44 Fälle (29,1 % des Gesamtkollektivs: $n = 151$), aufgrund von fehlendem, unzureichendem und somit nicht auswertbarem Tumormaterial von den Analysen ausgeschlossen.

Es erfolgte die Auswertung von 107 (100 %) gültigen Tumorproben (Tabelle 11; Tabelle 12).

Tabelle 11: Häufigkeitsverteilung des Färbeverhaltens für den Antikörper pAKT

Färbeverhalten	Häufigkeiten (n)	Prozent (%)	Score
Starke Färbung	64	42,2	2
Schwache Färbung	39	25,8	1
Keine Färbung	4	2,6	0
Gesamt	107	100	-

Anmerkung: Das Färbeverhalten lässt sich in die Kategorien „starke Färbung - schwache Färbung - keine Färbung“ einteilen. Die entsprechende Kategorie ist mit einem Score-Wert verknüpft.

Tabelle 12: Häufigkeitsverteilung für den prozentualen Anteil an gefärbten Zellen für den Antikörper pAKT

Prozentualer Anteil der Zellen	Häufigkeit (n)	Prozent (%)	Score
>50 % der Zellen	82	54,3	3
20-50 % der Zellen	17	11,3	2
1-20 % der Zellen	4	2,6	1
< 1 % der Zellen	4	2,6	0
Gesamt	107	100	-

Anmerkung: Bewertet wurde der prozentuale Anteil der anfärbbaren Zellen und in die entsprechenden Kategorien eingeteilt. Die entsprechende Kategorie wurde mit einem Score-Wert verknüpft.

Der daraus resultierende semi-quantitative Score lässt sich wie folgt zusammenfassen (Tabelle 13):

Tabelle 13: Häufigkeitsverteilung für den semi-quantitativen Produktscore für den Antikörper pAKT

Produktscore	6	4	3	2	1	0	Gesamt
Häufigkeit (n)	58	6	24	11	4	4	107
Prozent (%)	38,4	4,0	15,9	7,3	2,6	2,6	100

Anmerkung: Anhand der Scores für das Färbeverhalten und dem prozentualen Anteil der gefärbten Zellen wurde der semi-quantitative Produktscore für AKT berechnet.

Auch für diesen Antikörper wurde ein Cut-off für den positiven Nachweis gemäß ROC-Analyse bei einem Score von ≥ 5 gesetzt. Somit wiesen 58 (38,4 %) Tumorproben einen positiven AK-Nachweis auf.

3.6 Tumorsuppressor 21 (p21)-Expression

Die im TMA enthaltenen Tumorproben wurden hinsichtlich ihrer p21-Expression ausgewertet. Dazu wurde der Anteil der nukleär p21-positiven Zellen in Prozent im Tumor ermittelt. Im nächsten Schritt wurden sie mit einem Cut-off von 30 % in p21-positive und p21-negative Fälle kategorisiert.

Aufgrund von unzureichenden Tumorgewebeanteilen wurden 43 Fälle des Gesamtkollektivs (28,5 %) aus der Statistik ausgeschlossen.

Die Häufigkeitsverteilung erstreckte sich über eine Spannweite von 100 [0;100] der p21-positiven Zellen. Der Mittelwert betrug 47,5, der Median lag bei 50. Die Verteilung zeigte einen Peak bei 50 % ($n = 17$; 11,3 %), gefolgt von 70 % ($n = 16$; 10,6 %) und 0 % ($n = 14$; 9,3 %) der p21-positiven Zellen. Bei der Anwendung des Cut-offs von ≥ 30 % weist die Mehrzahl (67,5 %) im Gesamtkollektiv eine normale bzw. verminderte (< 30 % der positiven Zellen) p21-Expression auf. Lediglich 32,5 % weisen eine Überexpression (≥ 30 % der positiven Zellen) von p21 auf (Abbildung 13).

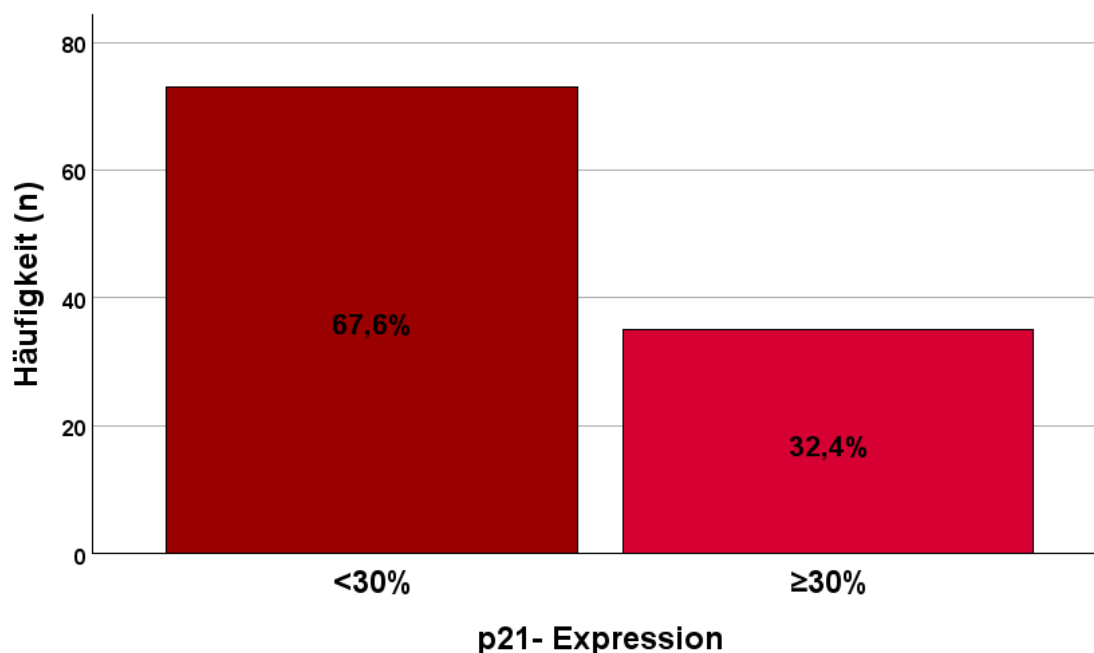


Abbildung 13: Häufigkeitsverteilung der p21-Expression bei einem Cut-off ≥ 30 % der positiv gefärbten Zellen

Abkürzungen: n: Anzahl; p21: Tumorsuppressor 21

Anhand der Auswertung zeigt sich, dass ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen der p21-Expression und der p53-Expression besteht (exakter Test nach Fisher: $p = 0,05$). Bei verminderter p21-Expression (< 30 %) sind die Patient:innen in diesem Kollektiv eher einem hohen UICC-Stadium (III oder IV) zuzuordnen (exakter Test nach Fisher: $p = 0,038$).

3.7 Überlebenszeitanalyse

Alle Überlebensanalysen wurden nach der Kaplan-Meier-Methode durchgeführt. Die Signifikanzüberprüfung erfolgte mit dem Log-Rank-Test und wurde auf ein Niveau von 5 % festgesetzt.

Initial wurden 151 Patient:innen in das Kollektiv eingeschlossen. Nach Beendigung des Beobachtungszeitraums, auf den 31.09.2022 datiert, waren noch 66,9 % ($n = 101$) am Leben, wohingegen 33,1 % ($n = 50$) bereits verstorben waren. Bei der Todesursache wurde nicht unterschieden, ob diese tumorassoziiert war oder der Tod aufgrund anderer Ursachen eintrat. Das mediane Überleben konnte aufgrund der zu geringen Ereignisse (Tod: $n = 50$) nicht berechnet werden.

Als Startpunkt für die folgenden Überlebensanalysen wurde das Datum der Erstdiagnose gewählt. Der Endpunkt wurde entweder als Tod, oder, wenn bis zum Ende des Beobachtungszeitraums noch lebend, die letzte Nachuntersuchung (follow-up) definiert.

3.7.1 Gesamtüberleben und progressionsfreies Überleben

Das mittlere Gesamtüberleben (OS) nach Diagnose war in diesem Kollektiv 8,72 Jahre (KI-95 %: 7,53; 9,91) (*Abbildung 14a*). Das 1-Jahres-Überleben betrug 92,7 %, das 5-Jahres-Überleben 73,5 %.

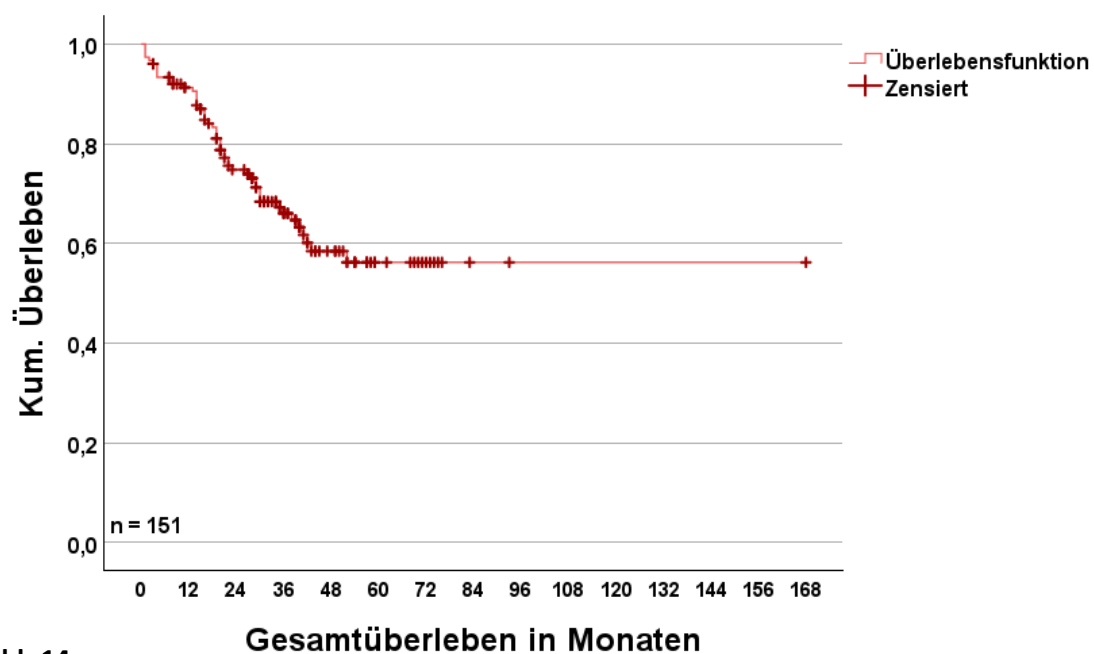


Abb.14a

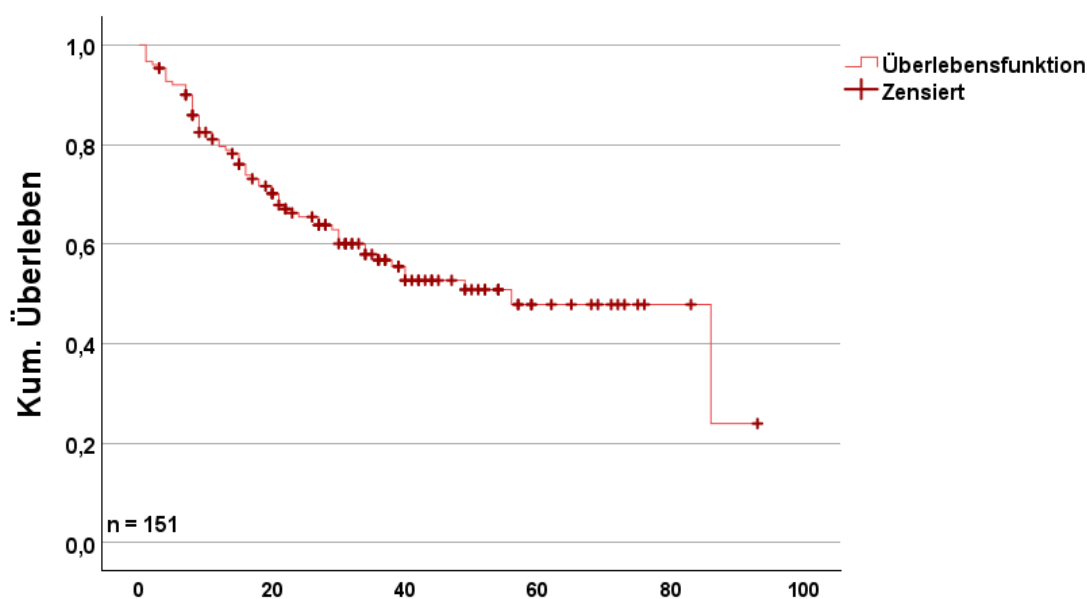


Abb. 14b progressionsfreies Überleben in Monaten

Abbildung 14: Kaplan-Meier-Überlebenskurve im Gesamtkollektiv

Abb. 14a: Gesamtüberleben in Monaten des Gesamtkollektive ($n = 151$).

Abb. 14b: Progressionsfreies Überleben des Gesamtkollektivs ($n = 151$) in Monaten.

Abkürzungen: n : Anzahl

Das mittlere progressionsfreie Überleben (PFS) lag im Gesamtkollektiv bei 4,47 Jahren (KI-95: 3,88; 5,05) (*Abbildung 14b*), das Mediane-PFS bei 4,66 Jahren (KI-95: 3,31; 6,1). Somit ließ sich das 1-Jahres-PFS als 79,6 % und das 5-Jahres-PFS als 47,8 % bestimmen.

3.7.2 Subgruppenanalysen zum Gesamtüberleben und progressionsfreien Überleben

Die erste Unterteilung des Gesamtkollektivs erfolgte anhand des CMTM6-CPS Status. Dazu wurde das Gesamtkollektiv in die Subgruppen CMTM6 „high“ (≥ 10) und „low“ (< 10) eingruppiert und in Bezug auf das Gesamtüberleben und das progressionsfreie Überleben analysiert. Es zeigte sich ein statistisch signifikanter Überlebensvorteil in der Subgruppe CMTM6-high im Gesamtüberleben (Log Rank: $p = 0,013$) (*Abbildung 15a*). Ein nicht statistisch-signifikanter Überlebensvorteil zeigte sich im progressionsfreien Überleben (Log Rank: $p = 0,054$) bei einem hohen CMTM6-Status (*Abbildung 15b*). Das mittlere OS bei CMTM6 von ≥ 10 betrug 9,4 Jahre (KI-95: 7,9; 10,7). Das mittlere PFS bei CMTM6 von ≥ 10 lag bei 4,6 Jahre (KI-95: 4,0; 5,2)

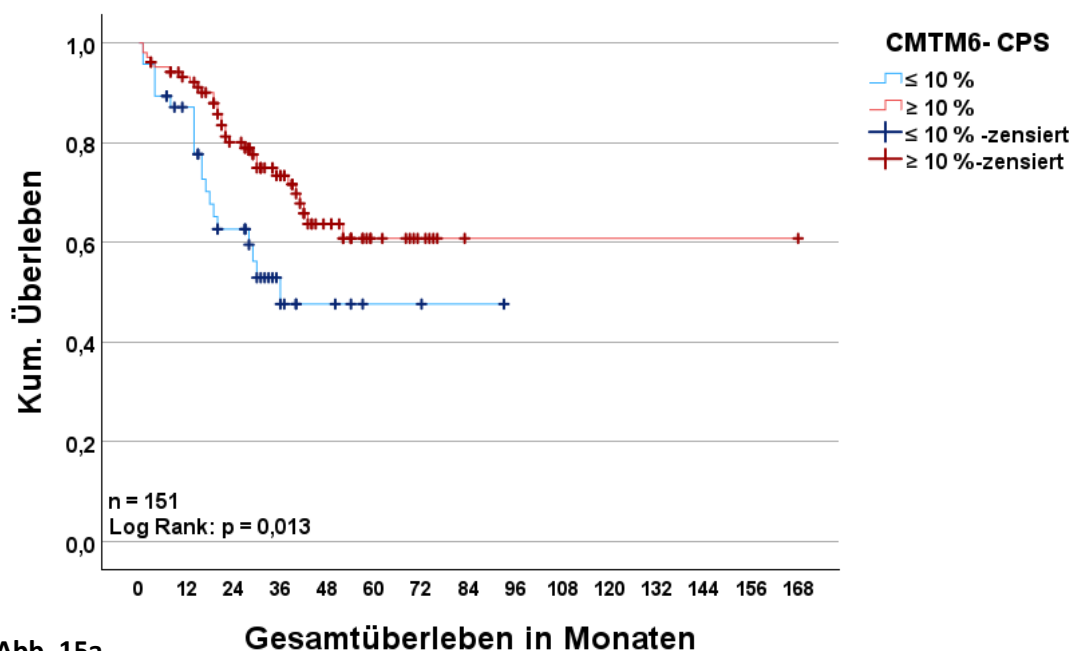


Abb. 15a

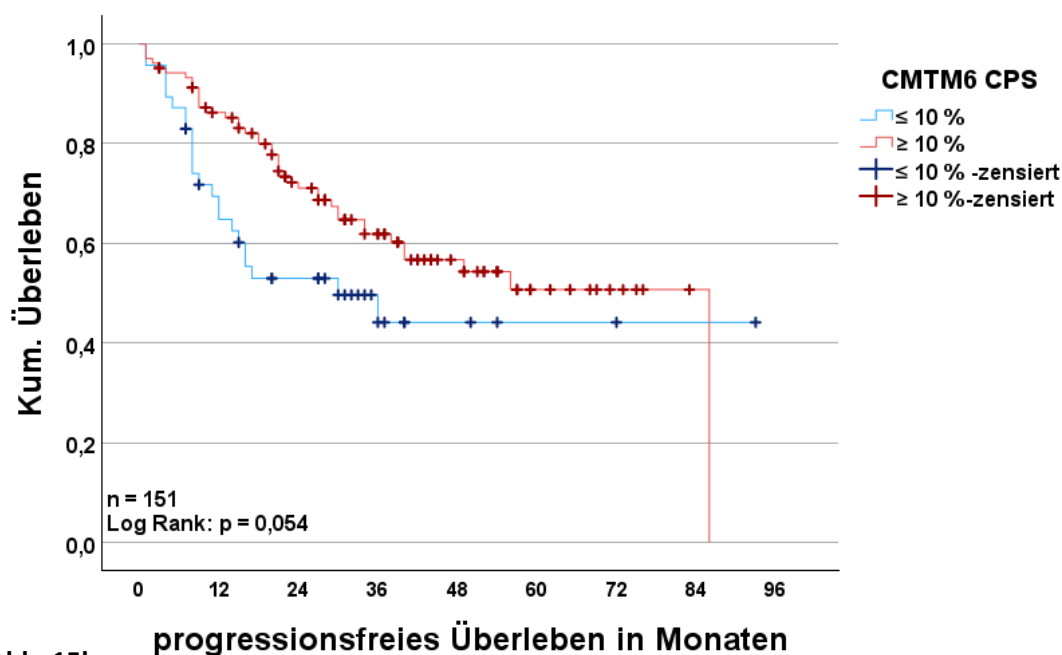


Abb. 15b

Abbildung 15: Kaplan-Meier-Überlebensanalyse des Gesamtkollektivs in Abhängigkeit des CMTM6-CPS

Abb. 15a: Gesamtüberleben in Monaten im Gesamtkollektiv in Abhängigkeit des CMTM6-CPS;

Abb. 15b: Progressionsfreies Überleben in Monaten in Abhängigkeit des CMTM6-CPS.

Abkürzungen: n: Anzahl; CMTM6: CKLF Like MARVEL Transmembrane Domaine 6; CPS: Combined Positive Score

Zudem konnte gezeigt werden, dass Patient:innen mit einer hohen CMTM6-Expression (≥ 10) in der Cisplatin behandelten Subgruppe ($n = 86$) sowohl ein statistisch signifikantes verlängertes Gesamtüberleben (Log Rank: $p = 0,016$) (Abbildung 16a) als auch ein verlängertes

progressionsfreies Überleben (Log Rank: $p = 0,002$) (Abbildung 16b) im Verhältnis zu nicht-Cisplatin behandelten Patient:innen ($n = 65$) aufwiesen. Das mittlere OS bei vermehrter CMTM6-Expression und Cisplatin-Therapie lag bei 5,3 Jahren (KI-95: 4,65; 9,5) und das PFS bei 4,7 Jahren (KI-95: 4,0; 5,4).

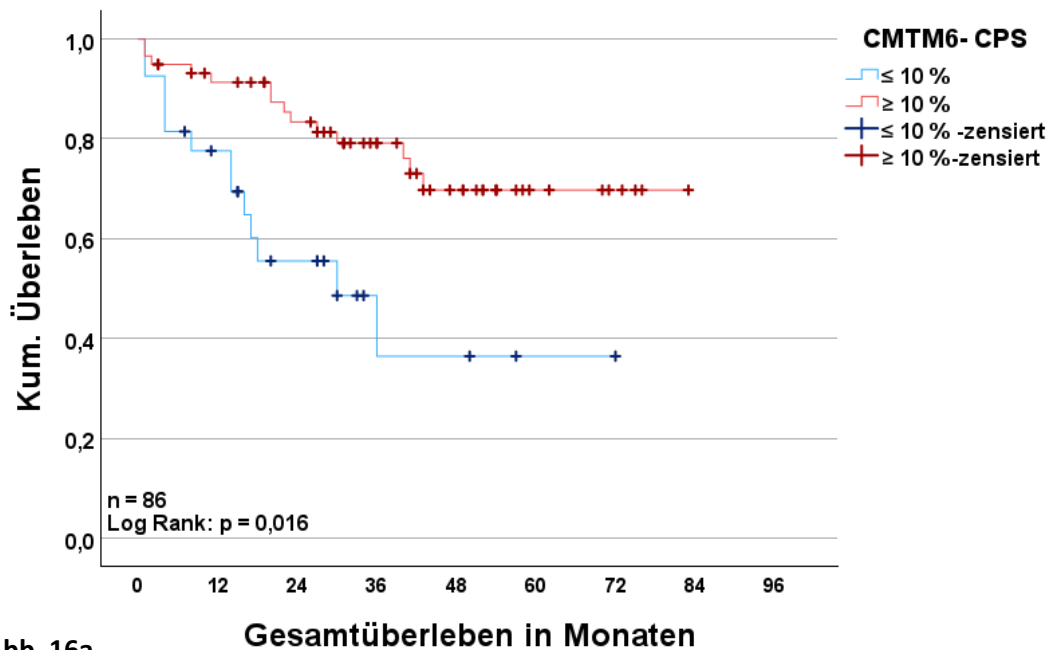


Abb. 16a

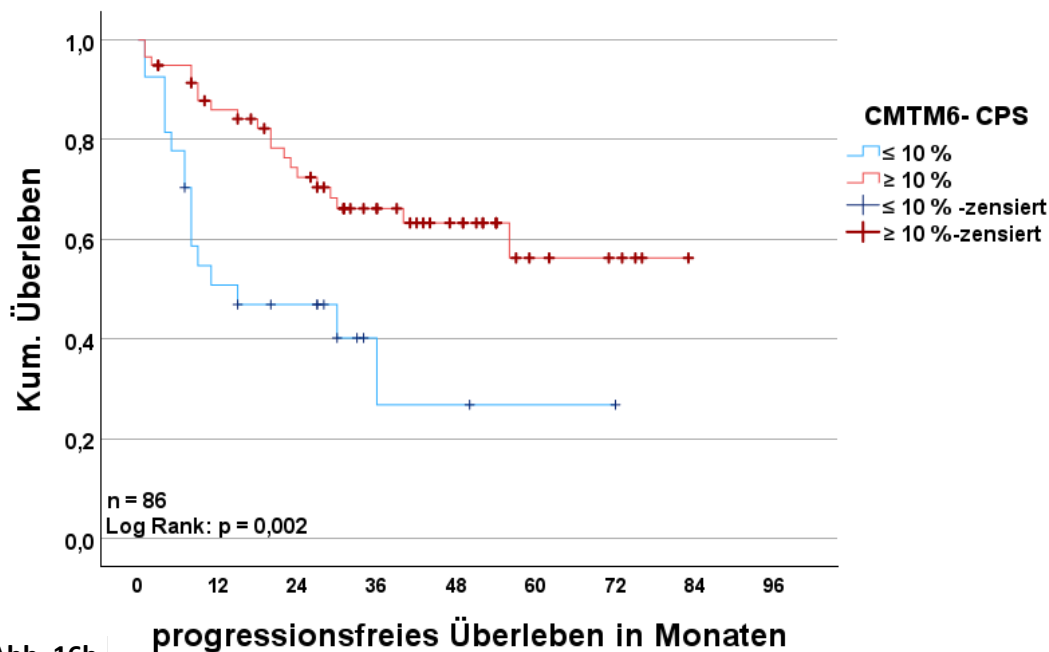


Abb. 16b

Abbildung 16: Kaplan-Meier-Überlebensanalyse der Cisplatin-therapierten Subgruppe in Abhängigkeit des CMTM6-CPs

Abb. 16a: Gesamtüberleben in Monaten in der Cisplatin-therapierten Subgruppe in Abhängigkeit des CMTM6-CPS;

Abb. 16b: Progressionsfreies Überleben in Monaten in der Cisplatin-therapierten Subgruppe in Abhängigkeit des CMTM6-CPS.

Abkürzungen: n: Anzahl; CMTM6: *CKLF Like MARVEL Transmembrane Domaine 6*; CPS: *Combined Positive Score*

Als nächstes wurde das Kollektiv hinsichtlich seiner verbesserten Überlebenschancen mit einer erhöhten PD-L1-Expression untersucht. Das Gesamtkollektiv enthielt 110 Fälle mit positiver PD- L1-Expression (≥ 1) und 41 Fälle mit negativer PD-L1-Expression (< 1). Dabei zeigte sich ein statistisch signifikanter Überlebensvorteil sowohl im Gesamtüberleben (Log Rank: $p = 0,017$) (Abbildung 17a), als auch im progressionsfreien Überleben (Log Rank: $p = 0,004$) (Abbildung 17b) bei einem positiven PD-L1-Status. Das mittlere OS für Patient:innen mit positiven PD-L1 Tumoren lag bei 9,3 Jahren (KI-95: 7,8; 10,78), das mittlere PFS bei 4,7 Jahren (KI-95: 4,1; 5,3).

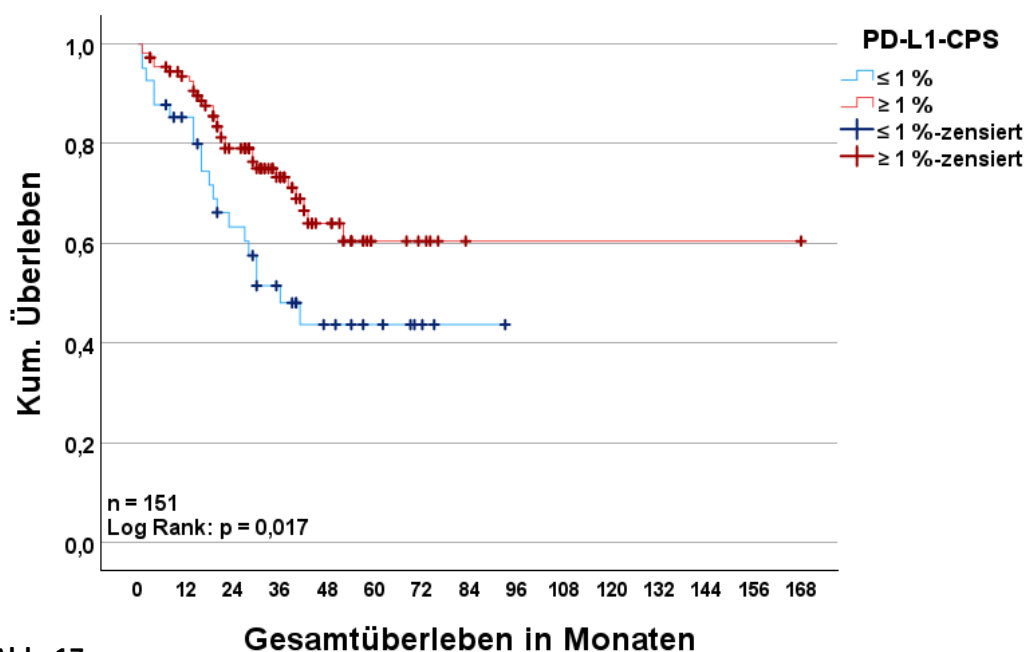


Abb. 17a

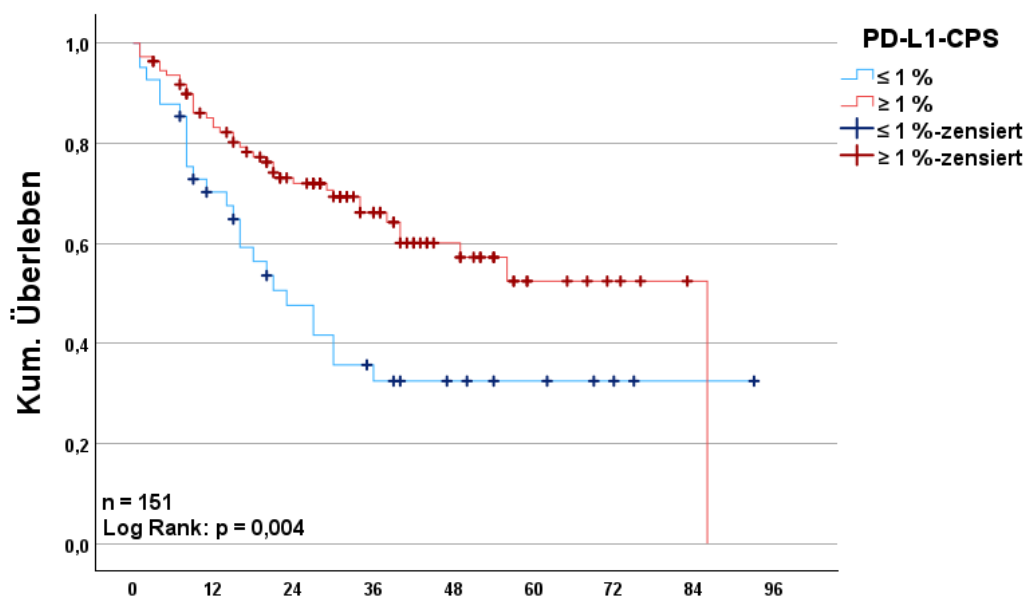


Abb. 17b progressionsfreies Überleben in Monaten

Abbildung 17: Kaplan-Meier-Überlebensanalyse im gesamten Kollektiv in Abhängigkeit vom PD-L1 Status

Abb. 17a: Gesamtüberleben in Monaten im Gesamtkollektiv in Abhängigkeit vom PD-L1-CPS;

Abb. 17b: Progressionsfreies Überleben in Monaten in Abhängigkeit vom PD-L1-CPS

Abkürzungen: n: Anzahl; PD-L1: Programmed Death Ligand 1; CPS: Combined Positive Score

Zusätzlich konnte in der Kohorte der PD-L1 positiven Tumore mit Cisplatin-Therapie ($n = 86$) ein statistisch signifikant verlängertes OS (Log Rank: $p = <0,001$) (*Abbildung 18a*) und PFS (Log Rank: $p = 0,001$) (*Abbildung 18b*) im Vergleich zur nicht-Cisplatin-therapierten Kohorte ($n = 27$) mit negativer PD-L1-Expression beobachtet werden. Das mittlere Gesamtüberleben unter Cisplatin und hoher PD-L1-Expression betrug 5,4 Jahre (KI-95: 4,7; 6,1) und das PFS 4,7 Jahre (KI-95: 4,0; 5,5).

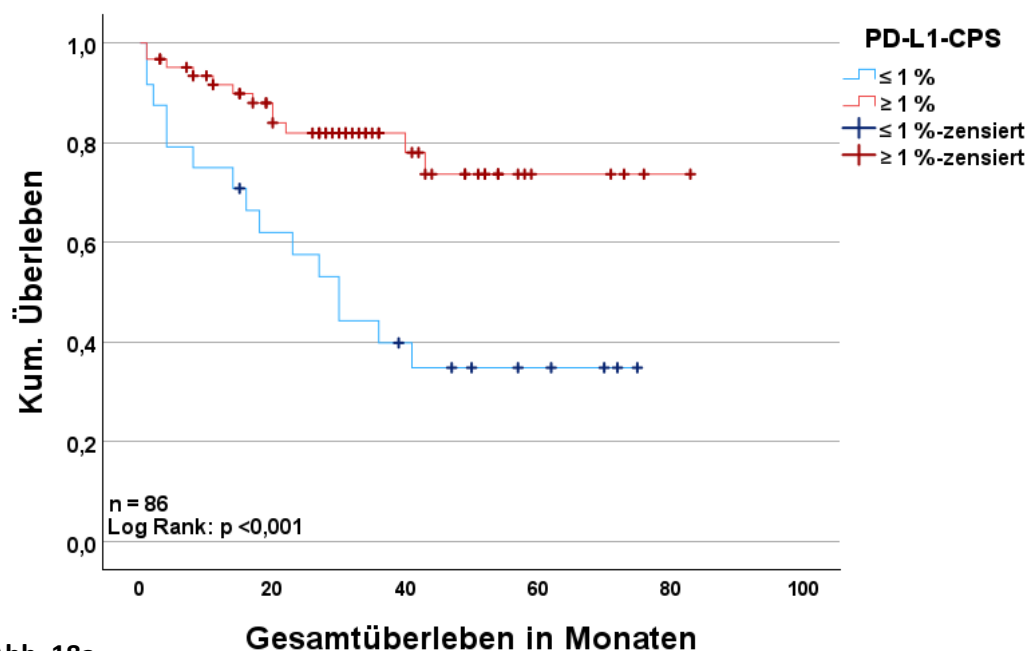


Abb. 18a

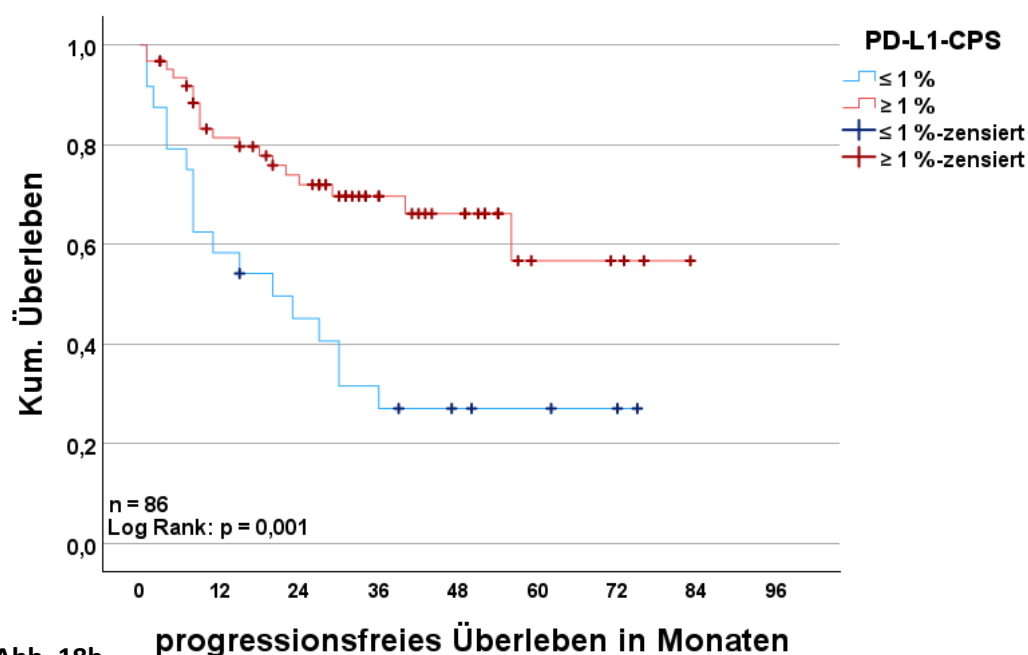


Abb. 18b

Abbildung 18: Kaplan-Meier-Überlebensanalyse der Cisplatin-therapierten Subgruppe in Abhängigkeit des PD-L1-CPS

Abb. 18a: Gesamtüberleben in Monaten in der Cisplatin-therapierten Subgruppe in Abhängigkeit des PD-L1-CPS;

Abb. 18b: Progressionsfreies Überleben in Monaten in der Cisplatin-therapierten Subgruppe in Abhängigkeit des PD-L1-CPS

Abkürzungen: n: Anzahl; PD-L1: Programmed Death Ligand 1; CPS: Combined Positive Score

Zuletzt wurde das Gesamtkollektiv in eine HPV-positive und eine HPV-negative Subgruppe unterteilt. Bei der Kategorisierung wurde nicht unterschieden, welcher *HPV-high-risk* Typ

vorlag. Achtunddreißig Patient:innen wiesen nach molekularen Analysen einen positiven p16/HPV-Nachweis auf, wohingegen 113 Patient:innen als HPV-negativ (p16-negativ) eingestuft wurden. Im Folgenden wurden diese zwei Subgruppen (HPV-positiv vs. HPV-negativ) hinsichtlich ihres Gesamt- und progressionsfreien Überlebens verglichen. Dabei zeigte sich ein signifikanter Überlebensvorteil (Log-Rank: $p = 0,006$) (Abbildung 19a) und ein verlängertes progressionsfreies Überleben (Log Rank: $p < 0,001$) (Abbildung 19b) für die Patient:innen mit einem positiven HPV-Status. Das mittlere Gesamtüberleben betrug bei positivem HPV-Status 6,6 Jahre (KI-95: 5,75; 7,44) und das mittlere progressionsfreie Überleben 6,45 Jahre (KI-95: 5,58; 7,32).

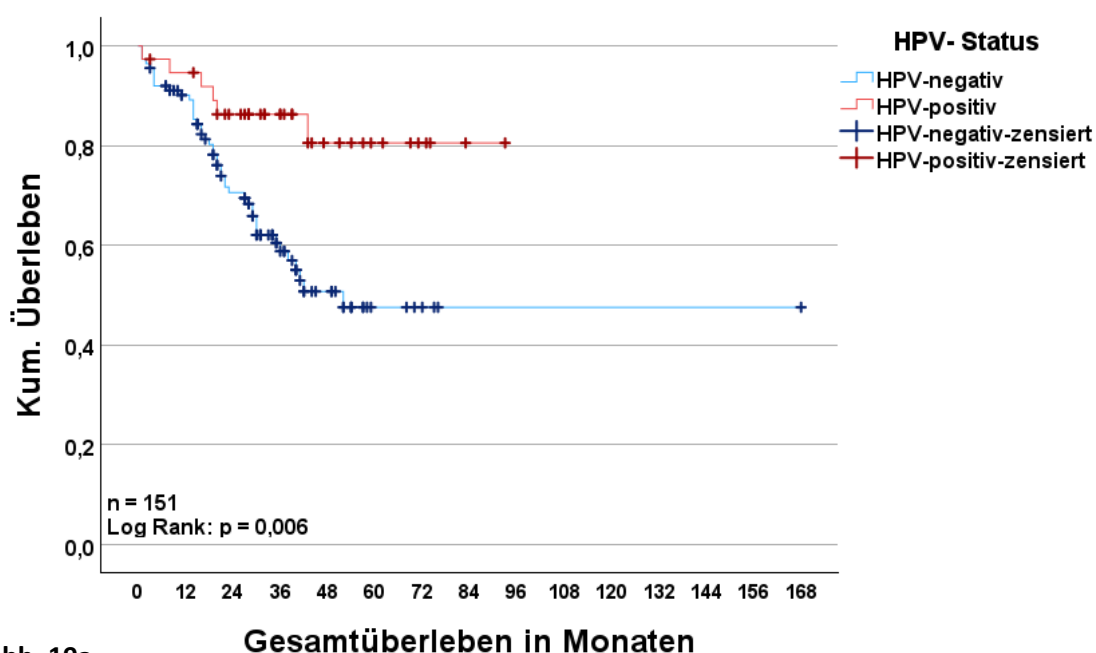


Abb. 19a

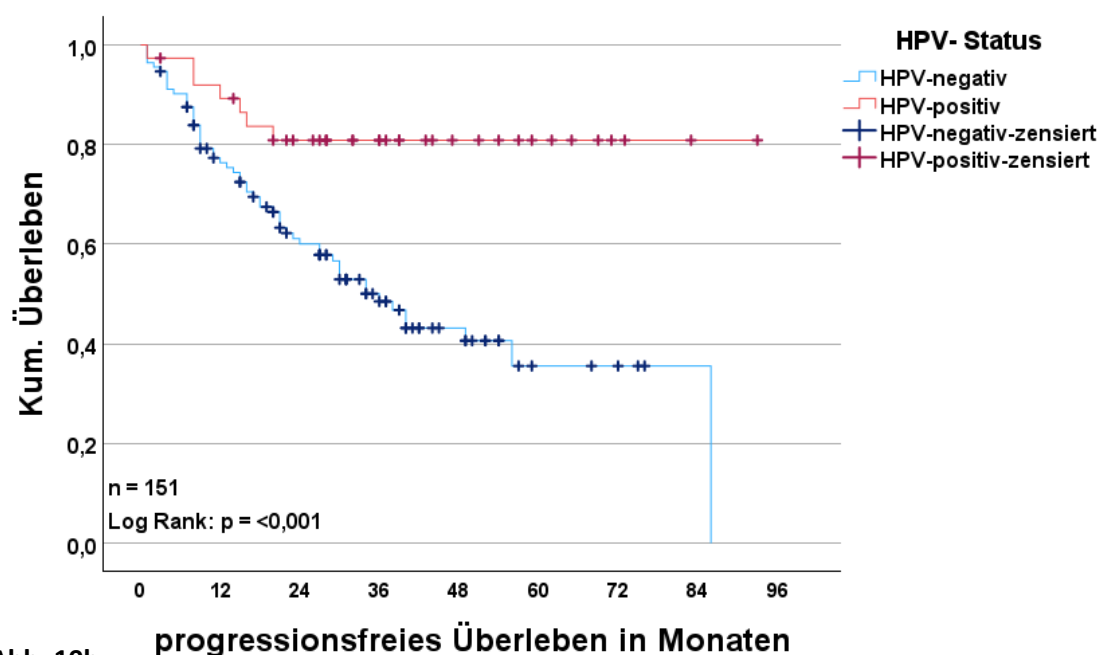


Abb. 19b

Abbildung 19: Kaplan-Meier-Überlebensanalyse des Gesamtkollektivs in Abhängigkeit vom HPV-Status

Abb. 19a: Gesamtüberleben in Monaten des Gesamtkollektivs in Abhängigkeit vom HPV-Status;

Abb. 19b: Progressionsfreies Überleben in Monaten des Gesamtkollektivs in Abhängigkeit vom HPV-Status.

Abkürzungen: n: Anzahl; HPV: Humanes Papilloma Virus

Zuletzt wurde die Kombination aus CMTM6-Expression, positiver PD-L1 Expression und dem HPV-Status hinsichtlich eines verlängerten progressionsfreien und Gesamtüberlebens analysiert.

So wiesen Patient:innen mit positivem HPV-Status und hoher CMTM6-Expression (≥ 10) ein verlängertes OS (Log-Rank: $p = 0,004$) und PFS (Log-Rank: $p = 0,001$) auf. Das mittlere Gesamtüberleben bei CMTM6 von ≥ 10 und positiven HPV-Status betrug 6,4 Jahre (KI-95: 5,7; 7,1), das PFS 6,2 Jahre (KI-95: 5,5; 6,9) (*data not shown*).

Die Untersuchung des OS und PFS für die Kombinationspartner mit CMTM6 von $\geq$ oder < 10 und PD-L1 von $\geq$ oder < 1 ergaben keinen statistisch signifikanten Überlebensvorteil (OS Log Rank: $p = 0,064$; PFS Log Rank $p = 0,194$) in den jeweiligen Subgruppen. Es ist jedoch ein deutlicher Trend erkennbar.

Patient:innen mit positivem HPV-Status ($n = 38$) hatten, wenn sie der Subgruppe mit positiver PD-L1-Expression angehören ($n = 29$), im Vergleich zu den HPV-negativen mit

negativer PD-L1-Expression ($n = 9$) einen Überlebensvorteil sowohl im progressionsfreien Überleben (Log-Rank: $p = 0,01$) (Abbildung 20b) als auch im Gesamtüberleben (Log-Rank: $p = 0,014$) (Abbildung 20a). Das mittlere OS bei PD-L1 von ≥ 1 und positivem HPV-Status betrug 6,6 Jahre (KI-95: 5,7; 7,0), das PFS 6,3 Jahre (KI-95: 5,6; 6,9).

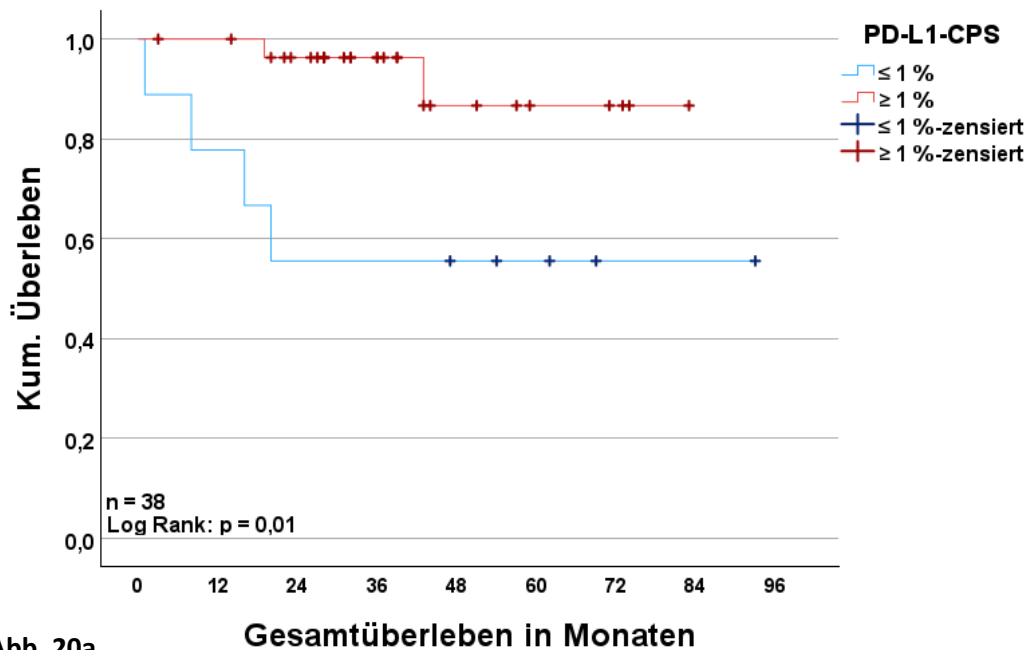


Abb. 20a

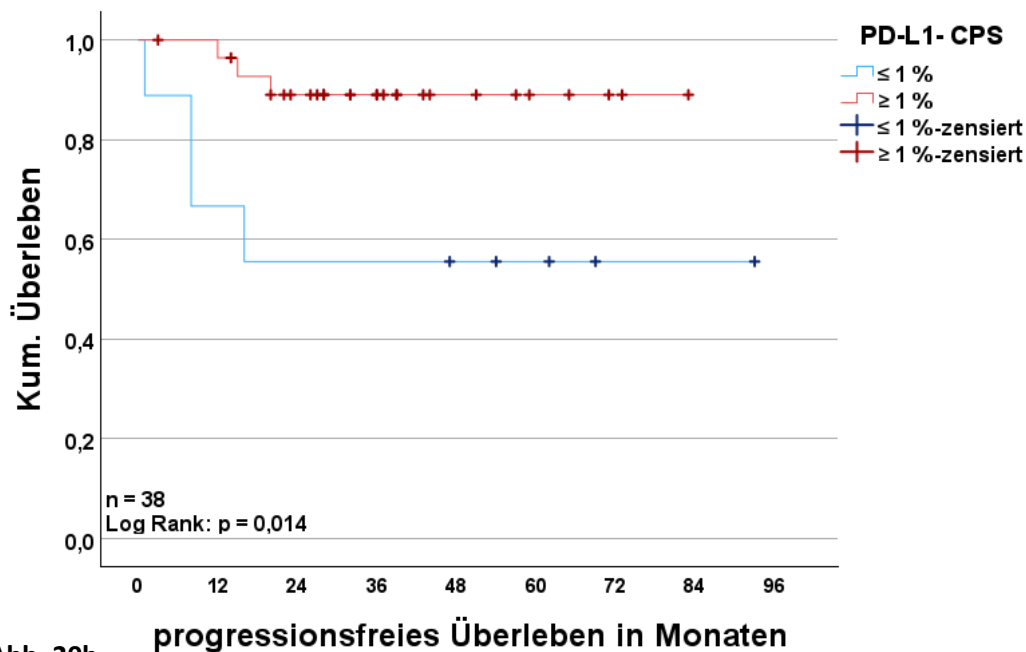


Abb. 20b

Abbildung 20: Kaplan-Meier-Überlebensanalyse in der Subgruppe mit positivem HPV-Status in Abhängigkeit des PD-L1-CPS

Abb. 20a: Gesamtüberleben in Monaten in der Subgruppe mit positivem HPV-Status in Abhängigkeit des PD-L1-CPS;

Abb. 20b: Progressionsfreies Überleben in Monaten in der Subgruppe mit positivem HPV-Status in Abhängigkeit des PD-L1-CPS

Abkürzungen: *n*: Anzahl; PD-L1: *Programmed Death Ligand 1*; CPS: *Combined Positive Score*; HPV: Humanes Papilloma Virus

4 Diskussion

4.1 Methodendiskussion

Kollektivgröße: Die Kollektivgröße von insgesamt 151 Fällen, welche ausschließlich an der Universitätsmedizin Rostock diagnostiziert und behandelt wurden, stellt eine Einschränkung für diese retrospektiv angelegte Studie dar. Eine Erweiterung des Kollektivs würde die Beobachtungen hinsichtlich des prognostischen und prädiktiven Aussagewertes für CMTM6 als weiterer Biomarker im HNSCC untermauern. Um dies auszugleichen, wurden in dieser unizentrischen Studie Tumore aller Stadien und Lokalisationen eingeschlossen. Dadurch gelang es, CMTM6 als Biomarker für ein positives Ergebnis (Outcome) hinsichtlich eines verlängerten OS und PFS zu identifizieren.

Klinisch-pathologische Daten: Eine lückenlose Dokumentation von klinisch-pathologischen Parametern ist im klinischen und wissenschaftlichen Setting nicht immer gegeben. Dies konnte ebenfalls in der vorliegenden Studie festgestellt werden. Aufgrund fehlender Daten wird die Signifikanz der untersuchten Kohorte bei einzelnen Parametern verringert. So konnten zum Beispiel der Noxenstatus (Alkohol- und Raucheranamnese) der Patient:innen nicht lückenlos erhoben und dokumentiert werden. Auch die Bestimmung des HPV-Status, inklusive molekularer Quantifizierung, war nicht für alle Patient:innen möglich. Informationen über onkologische Therapieverläufe, welche sich möglicherweise im Laufe des Beobachtungszeitraums geändert haben, konnten nicht in jedem Fall ausreichend evaluiert werden. Trotz sorgfältiger Recherche und mit Zuhilfenahme von universitär-internen Datenbanken sowie der Zusammenarbeit mit dem Krebsregister Mecklenburg-Vorpommern, konnten nicht alle Datenlücken diesbezüglich geschlossen werden.

Zudem konnte im Rahmen der Überlebensanalyse aufgrund fehlender Daten nicht differenziert werden, ob es sich um tumorassoziierte oder -unabhängige Todesfolgen handelte. Dadurch konnte keine direkte Aussage zum erkrankungsspezifischen Überleben getroffen werden.

Probenmaterial: Die Mehrfachverwendung der Präparate im Rahmen von Diagnostik und anderen wissenschaftlichen Untersuchungen mindert die Qualität des Tumormaterials in den entsprechenden Paraffinblöcken. Aufgrund von Materialerschöpfung, wurde eine adäquate IHC und somit zuverlässige Auswertung einiger Fälle erschwert. Dies führte zum Ausschluss dieser Tumorproben und verringerte die Fallzahl des initial zusammengestellte Kollektiv. Trotz

Hinzunahme von Proben neu erkrankter Patient:innen innerhalb des Beobachtungszeitraums, erbrachte dies keine wesentliche Erweiterung des Gesamtkollektivs.

Die Vorbereitung und lange Lagerungsdauer (teilweise >10 Jahre) der Tumorproben führte zu Denaturierung oder Maskierung von Proteinen, Antigenverlust und Verminderung des DNA-Gehalts (Karlsson & Karlsson, 2011). Studien belegen, dass neben einer langen Lagerungsdauer auch Einflüsse wie Luftfeuchtigkeit, Sauerstoffgehalt und Temperatur ausschlaggebend für den Erhalt der Antigene sind (Haragan et al., 2020). Jegliche Abweichung der Parameter von der Norm führt zu einem beschleunigten Antigenverlust der sich in einer verminderten Anfärbbarkeit der Proben, insbesondere für PD-L1, niederschlägt (ebd).

Resultierend daraus kann ein negativer Einfluss auf die Immunfärbungen nicht ausgeschlossen werden. Dies kann den prädiktiven und diagnostischen Wert von verschiedenen Proteinen einschränken. Um fehlerhafte Tumorproben zu identifizieren, wurden alle eingeschlossenen Fälle auf den Zustand der Präparate begutachtet. Somit konnte der negative Einfluss der Umwelt- und Lagerungsbedingungen auf die nachfolgenden Immunfärbung reduziert werden. Tumorproben, bei denen nach Begutachtung der Zustand als nicht ausreichend bewertet wurde, wurden aus dem Kollektiv ausgeschlossen. Der Ausschluss steigert die statistische Signifikanz indem falsch positive oder falsch negative Immunfärbungen vermieden werden.

Der molekulare HPV-Nachweis erfolgte auf DNA-Ebene. Bei unzureichendem oder beschädigtem Tumormaterial, verursacht durch lange Liegedauer und Mehrfachverwendung der Tumorproben, ist es möglich, trotz nachweisbarem Surrogatmarker (p16) keine ausreichende HPV-Analytik durchführen zu können (Molijn et al., 2005). So konnte in diesem Kollektiv in einigen Fällen keine exakte HPV-Typisierung stattfinden. Bei positivem p16 Nachweis ohne HPV-Typisierung wurde geschlussfolgert, dass bei diesen Patient:innen eine onkogen-transformierende HPV-Infektion vorlag. p16 gibt als etablierter Surrogatmarker für eine HPV-Infektion (Jouhi et al., 2017), somit führte eine p16 Positivität nicht zum Ausschluss der Tumorproben. Die entsprechenden Fälle wurden der HPV-positiven Subgruppe zugeordnet, was die Fallzahl der HPV-positiven Subgruppe ansteigen ließ und die Aussagekraft in den statistischen Rechenmodellen erhöhte.

Immunhistochemische Färbung: Die immunhistochemische Färbung ist ein standardisiertes und etabliertes Verfahren, sowohl in der Diagnostik als auch im wissenschaftlichen Kontext. Die Vollautomatisierung und Färbung nach Protokoll ermöglichte es dieses Verfahren mit geringer Fehlerquote zu nutzen. Trotz Standardisierung, regelmäßiger Wartung der Geräte und

mitführen von Positiv- und Negativkontrollen, kann es je nach Antikörper und verwendetem Ausgangsmaterial zu Einschränkungen in der immunhistochemischen Färbung kommen. Die Fragilität der eingesetzten Antikörper in Kombination mit verminderter Qualität der Tumorproben kann zu falsch negativen Ergebnissen führen. Die in dieser Studie untersuchte Signalachse AKT/pAKT ist ein entsprechendes Beispiel für die Grenzen der IHC. Die Phosphorylierung von AKT gilt als instabile Phosphorylierung und ist abhängig von weiteren zellulären Mechanismen, die diese Phosphorylierung stabilisieren (Yong Liao¹ and Mien-Chie Hung², 2010). Durch z.B. lange Liegedauer der Tumorproben kann es zum Lösen dieser Phosphorylierung kommen, sodass die Antigenität für den entsprechenden Antikörper im Gewebe abnimmt. Dies zeigt sich in der immunhistochemischen Färbung meist in einer geringeren oder keiner Anfärbbarkeit. Infolgedessen kann es zu einer erschwerten Auswertung und zu falsch negativen Ergebnissen kommen. Im Falle von AKT müssen zur vollständigen Aktivierung von AKT beide Serinreste (Serin 308 und 473) phosphoryliert werden (Scheid & Woodgett, 2003). Da jedoch kein Antikörper für beide Phosphorylierungsstellen erhältlich ist, können Tumorzellen, die womöglich positiv wären, als negativ eingestuft werden und somit die Aussagekraft der Färbung verringern. In dieser Arbeit wurde für die IHC der Antikörper für phosphoryliertes AKT an Serin 437 verwendet. Somit wird in der Auswertung dieser Färbung lediglich die Teilaktivierung von AKT berücksichtigt. Kommt es zur Lösung dieser instabilen Phosphorylierung am Serin 437, kann eine Aktivierung bei bestehender Phosphorylierung des Serin 308 nicht nachgewiesen werden. Schlussfolgernd kommt es zu falsch negativen Ergebnissen, die die statistische Signifikanz sinken lässt und Aussagen zu weiteren Korrelationen zwischen den agierenden Molekülen nicht mehr zulässt.

Die IHC-Färbungen lassen zudem lediglich deskriptive Untersuchungen am Tumorgewebe zu. Dies ist vor allem in Hinblick auf AKT und pAKT von Relevanz, da keine eindeutigen mechanistischen Rückschlüsse getroffen werden können. Diese Art von Studie dient daher der Aussage über beschreibende Hinweise und beobachtete Zusammenhänge. Um konkrete Zusammenhänge aufzudecken, sind *in vitro* Analysen von AKT und pAKT in CMTM6 niedrigen im Vergleich zu CMTM6 hoch-positiven HNSCC-Zelllinien sinnvoll. Dies würde dazu beitragen, ein fundierteres Verständnis über die molekularen Mechanismen im HNSCC zu erlangen. Somit lässt diese Arbeit keine Aussage über mögliche zwischengeschaltete und noch nicht identifizierte Variablen als Ursache für die beobachteten Zusammenhänge zwischen den untersuchten Molekülen zu.

Tumorheterogenität: Da in dieser Arbeit mit einem TMA gearbeitet wurde, werden lediglich kleine Tumorausschnitte betrachtet und spiegeln nicht die gesamte Heterogenität, welche als typisch für ein HNSCC eingestuft wird, wider (Weichert et al., 2018). Um diese Heterogenität im Tumor abzubilden, wurden die tumortragenden Areale zunächst auf den Paraffinblöcken markiert und anschließend drei Cores, sowohl von der Invasionsfront als auch vom Tumorzentrum gestanzt. Jedoch sichert diese Maßnahme weder, dass das Tumorgewebe in Gänze abgebildet wird, noch dass die Cores im nachfolgenden Schnitt auf gleicher Ebene im TMA-Block zum Liegen kommen. Die nicht in einer Ebene zu liegen kommenden Cores führen zu einem Tumorverlust oder diskrepanten Aussagen. Dies erschwert eine valide lichtmikroskopische Auswertung. Dennoch gibt es Arbeiten, die zeigen, dass durch mehrfaches Stanzen von Tumorgewebe für ein ausreichend großes Kollektiv belastbare Aussagen getroffen werden können (Tzankov et al., 2003).

Als Vorteil eines TMAs kann der direkte Vergleich von mehreren unterschiedlichen Tumorproben aufgrund der nahen räumlichen Anordnung angesehen werden. Zudem schont es die Ressourcen der IHC und erleichtert die Auswertung vieler Tumorproben *en bloc*.

Auswertung: Die IHC in dieser Studie erfolgte manuell anhand eines konventionellen lichtmikroskopischen Verfahrens. So unterliegt jede Färbung einer individuellen und subjektiven, durch jeden Pathologen etwas unterschiedlich ausgeführten Auswertung. Somit ist die Analogie zwischen unterschiedlichen Studien, welche auf der Grundlage von IHC basieren, kritisch zu bewerten. Das erschwert eine Vergleichbarkeit etablierter Scoring-Systeme und lässt somit die statistische Signifikanz sinken.

Um das Potential von CMTM6 zu prüfen, bedarf es eines einheitlichen Auswerteschemas. Dieses standardisierte Schema müsste in zukünftigen Studien harmonisiert werden, um eine entsprechende Vergleichbarkeit zu gewährleisten. Mit diesem Schritt könnte der Stellenwert von CMTM6 als Biomarker gestärkt werden. Die Methode der IHC wäre dafür eine kostengünstige und weit verbreitete Möglichkeit, den CMTM6-CPS parallel zum aktuell reflexartig bestimmten PD-L1 Status zu erheben.

Scoring-Systeme: Ein weiterer Kritikpunkt ist der Vergleich verschiedener Scoring-Systeme und deren Cut-off Werte. So erstreckt sich die Spannweite für die Positivität des PD-L1-CPS von ≥ 1 bis ≥ 30 . Für CMTM6 ist aktuell noch kein einheitlicher Cut-off definiert, sodass sich in der vorliegenden Studie, nach entsprechender ROC-Analyse und in Anlehnung an den PD-L1-CPS,

für den Cut-off von ≥ 10 für Positivität entschieden wurde. Auch die bereits angesprochene Subjektivität des Auswerter, die sich in der individuellen Bewertung für Positivität von Oberflächenmolekülen wiederfindet, kommt hier zu tragen. Eine korrekte und standardisierte Auswertung der einzelnen Bestandteile, welche essentiell für die Zusammensetzung des CPS sind, wäre notwendig. Die individuellen Ergebnisse verzerren eine Auswertung und die Vergleichbarkeit von Studien ist somit nicht immer gewährleistet (Kaur et al., 2023). Die Anwendung von künstlicher Intelligenz (KI) für die standardisierte Auswertung des PD-L1-CPS wäre ein mögliches Mittel, welches im diagnostischen Alltag angewendet werden kann. Aktuelle, retrospektiv angelegte Studien zeigen, dass KI durchaus in der Lage ist, vergleichbare Ergebnisse mit der digitalen Auswertung des PD-L1-CPS zu erzeugen (Hondelink et al., 2022; Puladi et al., 2021).

Aktuell ist noch nicht abschließend bewiesen, dass ein positiver CPS im Scoring definitiv als alleiniger und zuverlässiger Marker für ein Ansprechen einer Immuntherapie anzusehen ist. So bedarf es weitere Analysen wie z.B. Mutationsanalysen sowie einer genauen Charakterisierung des TME. Erst in Kombination der verschiedenen Parameter ist von einem verbesserten Ansprechen auszugehen. So ist die alleinige Verwendung des CP-Scoring in dieser Arbeit als entsprechender Kritikpunkt anzusehen.

4.2 Ergebnisdiskussion

Die unterschiedliche Studienlage zum Stellenwert von CMTM6 im HNSCC erweckte das Interesse an immunhistochemischen Analysen, die in einer retrospektiv angelegten Studie im kaukasischen Kollektiv über dieses Molekül durchgeführt wurden. Ziel war es, das Outcome der Patient:innen und ein Ansprechen auf die aktuellen Therapieoptionen besser voraussagen zu können. Dabei lag das Augenmerk darauf, eine mögliche Assoziation zwischen CMTM6 und PD-L1 im HNSCC zu identifizieren und die bereits etablierten Biomarker PD-L1 und p16 zu stärken. Die Analysen erfolgten retrospektiv an einem Kollektiv, welches sich im fortgeschrittenen Tumorstadium befand und mit einer leitliniengerechten Therapie an der Universitätsmedizin Rostock behandelt wurde.

Kollektiv: Das 151 Fälle umfassende Kollektiv weist eine für das HNSCC typische Geschlechterverteilung auf. Dabei waren Männer im Verhältnis zu Frauen fünfmal so häufig betroffen. Beim Vergleich mit der geschlechtsverteilten Inzidenz des RKI, sind Männer mit einer

Diagnose eines HNSCC in etwa doppelt bis vierfach so häufig betroffen (Johnson et al., 2020; Rki, 2017). Jedoch beobachtet das RKI bei Frauen ein Anstieg des Noxen-assoziierten HNSCC, was auf inzwischen zunehmenden Tabakkonsum bei Frauen zurückzuführen sein könnte (Zeiher et al., 2018).

Auch das mittlere Erkrankungsalter, welches beim RKI mit 65 Jahren angegeben wird, stimmt mit dem Erkrankungsalter, welches in diesem Kollektiv bei im Mittel 67,3 Jahren liegt, überein (Rki, 2017). Nach den Angaben des RKI erkrankten Männer in Deutschland im Mittel etwa 3 Jahre früher als Frauen (Männer: 66 Jahre vs. Frauen: 63 Jahre).

Tumorlokalisation: Die Tumorlokalisation in dem in der vorliegenden Studie erhobenen Kollektiv umfasst die typischen anatomischen Areale des HNSCCs. Vorherrschende Region in dem erhobenen Kollektiv ist, wie zu erwarten, die Mundhöhle, gefolgt von Oropharynx, Larynx und Hypopharynx. Gleiche Verteilungsmuster beschreibt Weichert *et al.* in seiner Arbeit zur Entstehung des nicht-kutanen Plattenepithelkarzinoms im Kopf-Hals-Bereich (Weichert et al., 2018). Ursächlich für die hohe Rate an in der Mundhöhle lokalisierten HNSCC ist die weiterhin hohe Noxenexposition (Alkohol und Tabak) in Mecklenburg-Vorpommern (Völzke et al., 2015). Diese Noxen zählen zu den Hauptrisikofaktoren für die Entstehung eines HNSCC (Hashibe et al., 2007).

Weltweit ist vor allem in Südostasien der Tabakkonsum stark verbreitet. Auch in diesen Regionen ist eine hohe Inzidenz an Noxen-assoziierten HNSCC im Bereich der Mundhöhle detektierbar (Johnson et al., 2020).

Wie Weichert *et al.* in seiner Arbeit beschreibt, ist das humane Papilloma Virus ein weiterer Risikofaktor zur Entstehung eines HNSCC (Weichert et al., 2018). Die typische Virus-assoziierte HNSCC Lokalisation ist aufgrund der Genese innerhalb des lymphoepithelialen Gewebes des Oropharynx anzutreffen. Dabei konnte unter anderem der Subtyp 16 als „*high-risk-Typ*“ identifiziert werden (Michaud et al., 2014). Dieser Subtyp zählt zu dem am häufigsten vorkommenden HPV-Typ im Zusammenhang mit onkogen treibenden Infektionen (ebd.). Der führende Subtyp im vorliegenden Kollektiv ist ebenfalls Typ 16. Eine regionale Häufung an HPV-positiven Karzinomen ist nach Ansicht von Johnson *et al.* auf niedrige Impfquoten und zunehmende globale Durchseuchung zurückzuführen (Johnson et al., 2020). Ein Anstieg von HPV-assoziierten HNSCC ist besonders bei Männern zu verzeichnen und mit der nicht obligaten Prophylaxe in diesem Geschlecht zu begründen (Garolla et al., 2023).

Therapie: Die adjuvante Chemotherapie bei fortgeschrittenem oder metastasiertem HNSCC, wie von der AWMF als S-3-Leitlinie herausgegeben, priorisiert Cisplatin als Erstlinientherapie (Wolff, 2021). Das vorliegende Kollektiv weist in der Verteilung eine primäre platinhaltige Chemotherapie auf. In der vorliegenden Studie spiegelt das primär platinhaltig-therapierte Kollektiv nicht das breite Spektrum an Therapiemöglichkeiten für das HNSCC im adjuvanten Setting wider (Ghosh et al., 2022). Die Mehrfachtherapielinien sind sehr divers und könnten, je nach Auswahl der Therapie, den in dieser Arbeit beobachteten Effekt abmildern oder verstärken.

Die Anzahl an ICI behandelten Patienten in diesem Kollektiv ist dabei vergleichsweise gering. Dies liegt zum einen daran, dass viele ICI erst im Laufe des Beobachtungszeitraums ihre Zulassung für die Therapie des fortgeschrittenen und metastasierten HNSCC erhalten haben. Zum anderen lässt sich nach Aussage der behandelnden Onkologen an der UMR erkennen, dass der an einem HNSCC erkrankte Mecklenburger einer völlig neuen Therapieoption eher skeptisch entgegensteht. Um den beobachteten Effekt von CMTM6 in der Cisplatin-therapierten Subgruppe auf andere Subgruppen zu übertragen, sind weitere prospektive Studien nötig, die vor allem die ICI-therapierte Subgruppe betrachten.

Überleben: Nach Angaben des RKI kommt es häufig erst im fortgeschrittenen Stadium zur Diagnose eines HNSCC, wodurch ein schlechtes 5-Jahres-Gesamtüberleben von 43,5 % vor allem in den UICC-Stadien III und IV zu verzeichnen ist (RKI, 2017). Ähnliche Zahlen zeigt das in dieser Studie untersuchte Kollektiv. Die UICC-Stadien III und IV sind in der Mehrzahl vertreten, aber das mittlere 5-Jahres-Überleben über alle Stadien im Gesamtkollektiv liegt im Vergleich zur Literatur mit 73,5 % deutlich über den publizierten Überlebensraten. Ursächlich für das Vorkommen der fortgeschrittenen Karzinome ist der lange unentdeckte, subklinische Verlauf (Bhatia & Burtneß, 2023). Zieht man die sozial-regionalen Gegebenheiten in Mecklenburg-Vorpommern in Betracht, könnte dies als ausschlaggebende Ursache zum Tragen kommen. Das im Vergleich mit der Literatur gute 5-Jahres-Überleben dieses Kollektivs lässt sich durch eine relativ geringe Kollektivgröße erklären. Dieser Punkt sollte bei der Interpretation der Arbeit berücksichtigt werden.

Zusammenfassend sind alle klinisch-pathologischen Daten unseres Kollektivs, die zur Entstehung eines HNSCC, der Beeinflussung des Gesamtüberlebens und des Ansprechens auf eine Therapie beitragen, mit denen der Literatur vergleichbar (Baba et al., 2018; Johnson et al.,

2020; Rki, 2017; Stenzinger et al., 2014). Daraus abgeleitet ist das in der vorliegenden Studie erhobene Kollektiv als repräsentativ für die Tumorentität des HNSCCs anzusehen. Es lässt somit weitere Vergleiche hinsichtlich des prognostischen und prädiktiven Werts von CMTM6 zu.

CMTM6 ist ein Molekül, welches in vielerlei Hinsicht Einfluss auf die Prozesse in tumorös veränderten Zellen, aber auch auf das umgebene TME nimmt. Daraus lässt sich ableiten, dass nicht nur eine einzige Funktion von CMTM6 ausschlaggebend ist, sondern eine Expression von CMTM6 verschiedene komplexe Veränderungen hervorruft. Somit kommt es je nach vergleichender Studie zu unterschiedlichen Aussagen über den Einfluss von CMTM6 und dessen prognostischen und prädiktiven Wert.

Der bereits etablierte Biomarker PD-L1 dient zur Entscheidungshilfe für den Einsatz einer Immuntherapie. Seine prädiktive Wertigkeit ist jedoch abhängig vom PD-L1-CPs. So ist die Ausprägung ein maßgeblicher Faktor für ein Ansprechen einer ICI-Therapie (Wuerdemann et al., 2020). Dadurch sollte neben PD-L1 ein weiterer Biomarker, wie in der zugrundeliegenden Studie CMTM6, als ergänzende Entscheidungshilfe etabliert werden.

CMTM6 und TME: Chen *et al.* beschreibt in seiner Arbeit über CMTM6 im HNSCC, dass CMTM6 über PD-L1 die Einwanderung von Lymphozyten und somit die körpereigene, anti-tumorale Abwehr unterbindet. Bei isolierter Unterdrückung der CMTM6-Expression in *in vivo* Experimenten, kommt es zur Rückkehr der tumorinfiltrierenden T-Lymphozyten. Dadurch konnte eine adäquate Anti-Tumorimmunität wiederhergestellt werden. Anhand dieser Tatsache wertet Chen *et al.* CMTM6 als einen Biomarker von schlechter prognostischer Bedeutung im HNSCC. Zu erwähnen hierbei ist jedoch, dass diese Studie an Zelllinien mittels RNA-Analysen durchgeführt wurde. Dabei wurde jedoch nicht das *in vivo* vorkommende TME näher betrachtet.

Im Gegenzug dazu beschreibt Peng *et al.* in seiner Arbeit unter Berücksichtigung des TME, dass es bei hoher CMTM6-Expression im kolorektalen Karzinom zur vermehrten Einwanderung von tumorinfiltrierenden Lymphozyten kommt. Über diesen Mechanismus wird die körpereigene anti-tumorale Abwehr wiederhergestellt.

Aufgrund seiner Ergebnisse bewertete er, dass eine hohe CMTM6-Expression als positiver prognostischer und prädiktiver Wert bei 5-Fluor-Uracil behandelten kolorektalen Karzinomen anzusehen ist und das Gesamtüberleben verlängert.

Vorangegangene Studien unserer Arbeitsgruppe konnten ebenfalls beweisen, dass eine hohe CMTM6-Expression mit einer hohen Anzahl an tumorinfiltrierenden Lymphozyten korreliert.

Zusätzlich war zu beobachten, dass eine hohe CMTM6-Expression (CPS ≥ 10) in Kombination mit einer erhöhten Anzahl an TILs mit einem verlängerten Gesamtüberleben zusammenhängt.

Im vorliegenden Kollektiv dieser Studie ist zu beobachten, dass es bei alleiniger Betrachtung der CMTM6-Expression es zu einem signifikant verlängertem Gesamt- und progressionsfreiem Überleben bei einer hohen CMTM6-Expression und einem CPS ≥ 10 kommt. Da in den statistischen Berechnungen der CMTM6-CPS integriert ist, welcher die positiven Immunzellen miteinschließt, wird in gewissen Maßen das TME ebenfalls berücksichtigt. Aufgrund dieser Ergebnisse, die mit den Ergebnissen von Peng *et al.* übereinstimmen, kann geschlussfolgert werden, dass es bei einer hohen CMTM6-Expression zur Reduktion der Immunevasion kommt. Auf Grundlage dessen wird als Resultat der vorliegenden Studie eine CMTM6-Expression von ≥ 10 im HNSCC als guter prognostischer Wert angenommen.

CMTM6 und HPV: Neben den Noxen Tabak und Alkohol stellt eine HPV-Infektion einen wesentlichen Risikofaktor zur Entstehung eines HNSCC im Oropharynx dar (Weichert et al., 2018). Die steigenden Impfquoten bei Frauen senken das Risiko erheblich, wohingegen Männer zunehmend von HPV-positiven Karzinomen betroffen sind (Johnson et al., 2020).

Johnson *et al.* beschreibt in seiner Arbeit, dass sich bei einem HPV-positiven Karzinom das TME erheblich zugunsten der anti-tumoralen Immunabwehr verschiebt. Daher lässt sich bei HPV-positiven Karzinomen auch ein besseres Outcome verzeichnen.

In dieser Arbeit wurde eine Analyse des OS und PFS vorgenommen, in der gezeigt wurde, dass Patient:innen in der Kombination von hoher CMTM6-Expression und positivem HPV-Status ein statistisch signifikant längeres Überleben aufwiesen. Somit lässt sich schlussfolgern, dass sich neben HPV auch die CMTM6-Expression auf das TME auswirkt, was wiederum zu einem verbesserten Outcome der Patient:innen führt. Somit ist CMTM6 im untersuchten Kollektiv nicht wie von Chen *et al.* als schlechter, sondern als guter Biomarker anzusehen.

PD-L1 und HPV: Selbige Ergebnisse lassen sich in der Kombination von positivem HPV-Status und einem PD-L1 CPS von ≥ 1 erkennen.

CMTM6 und PD-L1: CMTM6 nimmt eine entscheidende Rolle bei der membranständigen Stabilisierung von PD-L1 ein (Zhang et al., 2022) und ist ein ubiquitär exprimiertes Molekül. Deshalb ist es wichtig, zu differenzieren in welchem Kompartiment die Expression lokalisiert ist. Mögliche Unterschiede bestehen auch zwischen Tumorzellen und dem TME. Das TME besteht vorrangig aus Makrophagen oder Lymphozyten. Die Arbeitsgruppe um

Zugazagoitia *et al.* konnte in einer retrospektiven Studie zeigen, dass bei gleichzeitiger hoher CMTM6- und PD-L1-Expression im tumorumgebenden Stroma (Makrophagen) im nicht-kleinzelligem Bronchialkarzinom (NSCLC) die Patienten ein statistisch signifikant besseres Ansprechen auf eine Immuntherapie zeigten (Zugazagoitia *et al.*, 2019). Das verbesserte Ansprechen auf die Immuntherapie zeigte sich in der Studie um Zugazagoitia *et al.* in einem statistisch signifikant verlängerten OS im Vergleich zur Patientenkohorte mit niedriger CMTM6- und PD-L1-Expression. In dieser Arbeit konnte somit der positive prädiktive Wert von CMTM6 im NSCLC untermauert werden.

In der vorliegenden Arbeit wurden durch die Auswertung des PD-L1- und CMTM6-Status anhand des CPS mehrere Kompartimente der Expression abgebildet. So fließen im CPS sowohl die positiven Tumorzellen als auch das positive TME (Lymphozyten und Makrophagen) in die Bewertung ein. Die Daten zeigten, dass eine hohe CMTM6-Expression mit einer hohen PD-L1-Expression korreliert. Eine hoher bzw. positiver Wert für CMTM6 sowie PD-L1 ist assoziiert mit einem verlängerten OS und PFS. Diese Beobachtungen bestätigen sich in der Cisplatin-therapierten Subgruppe. Patienten, deren Karzinome eine hohe bzw. positive Expression von CMTM6 und PD-L1 aufweisen, zeigen in dem beobachteten Kollektiv ein verbessertes Ansprechen auf die derzeit verfügbaren Therapieoptionen. Als Ursache ist eine Beeinflussung des Tumormikromilieus durch die Immun-Checkpoint-Moleküle anzunehmen, was durch die Daten von Zugazagoitia *et al.* unterstrichen wird (Zugazagoitia *et al.*, 2019). Weitere Studien mit einer ICI-therapierten HNSCC-Kohorte sind nötig, um die Erkenntnisse der genannten NSCLC-Studie auf eine entsprechend behandelte HNSCC-Gruppe zu transferieren, welche ausschließlich Plattenepithelkarzinome, nicht aber Adenokarzinome einschließt. Aufgrund dieser Gegebenheit sollten die Ergebnisse unter dieser Einschränkung interpretiert werden.

CMTM6 und Therapie: In einigen Studien wird CMTM6 in Zusammenhang mit einer möglichen Cisplatin-Resistenz gebracht. So beschreibt Mohapatra *et al.* in seiner Studie die Beeinflussung des Wnt-Signalwegs, welcher durch CMTM6 aktiviert wird und im nachfolgenden Genprodukte exprimiert, welche zu Resistenz führen. Hierbei ist zu erwähnen, dass diese Studie ausschließlich an Zelllinien erfolgte.

Bei der Untersuchung des für diese Studie zusammengetragenen Kollektivs, konnten gegenläufige Ergebnisse festgestellt werden. So kam es bei vermehrter Expression von CMTM6 und der Behandlung mit platinhaltigen Chemotherapeutika zu einem statistisch signifikant verlängertem Gesamt- und progressionsfreiem Überleben. Somit steht die Expression von

CMTM6, im in dieser Arbeit zusammengestellten kaukasischen Kollektiv, nicht im Zusammenhang einer Cisplatin-Resistenz. Stattdessen ist CMTM6 aufgrund des guten Ansprechens der Therapie als Biomarker mit zusätzlich gutem prädikativem Wert zu bewerten. Auch unter PD-L1 und Cisplatin-Therapie weisen die Patient:innen ein verlängertes OS und PFS auf.

In der hiesigen Studie wurden lediglich Patient:innen mit platinhaltiger Therapie eingeschlossen. Dies resultiert durch die erst im Verlauf des Studienzeitraums eingeführte Zulassung der Immun-Checkpoint-Inhibitoren im fortgeschrittenen und metastasierten HNSCC. PD-L1 stellt bereits einen etablierten Biomarker im HNSCC dar, wobei durch Einsatz von ICI bisher kein drastischer Anstieg des OS zu verzeichnen ist. Dennoch lässt sich festhalten, dass in diesem Kollektiv Patient:innen mit einem PD-L1 von ≥ 1 und einer Cisplatin-Therapie ein statistisch signifikant besseres OS und PFS aufwiesen.

CMTM6 und weitere untersuchte Proteine: Gemäß aktueller Studien und Forschung nimmt CMTM6 eine regulierende Rolle hinsichtlich der Beeinflussung des Zellzyklus, Proliferation und Überleben der Tumorzelle über nachgeschaltete Signalachsen ein (Long et al., 2023; Marquard & Jücker, 2020; Mohapatra et al., 2022; Scheid & Woodgett, 2003; Shaha et al., 2024; Yong Liao1 and Mien-Chie Hung2, 2010).

Auf Immunhistochemie basierende Erkenntnisse unserer Arbeitsgruppe zeigten, dass eine hohe CMTM6-Expression mit einem mutationstypischen Färbemuster für den Tumorsuppressor *TP53* korreliert (Hyodo et al., 2022). Eine onkogene Mutation im *TP53*-Gen bedingt typischerweise eine hohe Mutationslast (ebd.). Diese führt zur vermehrten Bildung von Neoantigenen, was wiederum das TME stimuliert. Weitere immunmodulatorische Mechanismen fördern im Rahmen der Immunevasion die Expression diverser Immun-Checkpoint-Moleküle wie z.B. PD-L1. In diesem Zusammenhang dürfte auch die Ursache des in p53-mutierten HNSCCs erhöhten CMTM6-Status liegen.

Weitere Ergebnisse dieser Arbeit zeigten eine positive Korrelation zwischen dem CMTM6-Status und der Anfärbung für die Kinase AKT einschließlich ihrer aktivierten/phosphorylierten Form pAKT. Eine erhöhte Aktivität von AKT fördert Überleben und Wachstum der Tumorzelle und steht in einem möglichen Zusammenhang mit einer Cisplatin-Resistenz (Mohapatra et al., 2021, 2022). Mohapatra *et al.* zeigten, dass eine erhöhte CMTM6-Expression zu einer Stabilisierung der Enolase1 führt. Dies begünstigt eine gesteigerte Aktivierung von AKT. Der durch AKT regulierte Wnt- β -Catenin-Signalweg und die nachfolgende Beeinflussung der

Krebsstammzellen steht im Zusammenhang mit einer Cisplatin-Resistenz. Aufgrund dessen bewerten Mohapatra *et al.* CMTM6 als einen Biomarker für schlechte Prognosen im OSCC. Eine ähnliche Beobachtung konnte in dieser Studie gemacht werden. Eine vermehrte Expression von CMTM6 geht ebenfalls mit einer gesteigerten Expression und Aktivität von AKT einher. Im Gegensatz zu Mohapatra *et al.* ist in der vorliegenden Kohorte eine hohe CMTM6-Expression mit einem verbesserten Ansprechen auf eine RCT vergesellschaftet. Die gegenläufigen Ergebnisse könnten unter anderem am unterschiedlichen Aufbau der Studien liegen. Mahapatra *et al.* untersuchten *in vitro* Zelllinien und deren weitere nachgeschaltete Proteine der oben beschriebenen Signalachse. Diese könnten ausschlaggebend für eine Cisplatin-Resistenz sein. Zu beachten ist, dass in der vorliegenden Studie außer der Aktivierung der ATK-Signalachse keine weiterführenden Untersuchungen durchgeführt wurden und somit keine Aussage über die daraus resultierenden, weiteren Veränderungen im Signalweg getroffen werden können.

Eine erhöhte CMTM6-Expressionen begünstigt erwiesenermaßen eine gesteigerte Kinaseaktivität. Durch die verstärkte Aktivität von AKT wird über weitere Signalkaskaden das TME verändert (Marquard & Jücker, 2020; Shaha et al., 2024). Li *et al.* zeigten, dass sich durch hypoxischen Stress die Stoffwechsellage innerhalb der Tumorzelle ändert. Die Aktivierung von GSK-3 β als nachgeschaltete Kinase von AKT begünstigt die anaerobe Energiegewinnung der Tumorzelle und sichert somit ihr Überleben. Gleichzeitig verschiebt sich jedoch das TME in Richtung eines laktatreichen Milieus (Li et al., 2012).

Li *et al.* schlussfolgern aus diesen Ergebnissen, dass sich das saure TME negativ auf ein Ansprechen einer RCT im HNSCC auswirkt (ebd).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen jedoch, dass trotz vermehrter Expression von CMTM6 und der gesteigerten Aktivität von AKT es zu einem verlängerten progressionsfreien sowie Gesamtüberleben kommt und eine gesteigerte CMTM6-Expression im HNSCC als günstiger prognostischer und prädiktiver Biomarker zu bewerten ist. Die Diskrepanz der beiden Studien ist jedoch nicht abschließend geklärt. In Zusammenschau der Ergebnisse der aktuellen Forschung (Huang et al., 2022; Li et al., 2012; Marquard & Jücker, 2020; Vivanco & Sawyers, 2002; Xie et al., 2019) kommt es durch CMTM6 zur verstärkten Aktivität von AKT und der nachgeschalteten Signalachsen. Diese sind jedoch sehr vielfältig in ihrem Effekt auf die Tumorzelle und fallen je nach Tumorentität sehr unterschiedlich aus. Somit sollte diese Studie mit den entsprechenden Ergebnissen als eine Einzelbeobachtung bewertet werden. Es ist

jedoch nicht ausgeschlossen, dass CMTM6 einen erheblichen Einfluss auf den Stoffwechsel durch unterschiedliche regulatorische Mechanismen nimmt. In welchem Umfang sich dies positiv oder negativ auf das Ansprechen einer RCT sowie ein Überleben der Tumorzelle eines HNSCC auswirkt, muss in weiteren *in vivo* und *in vitro* Experimente untersucht werden.

Anders als bei Huang *et al.* im HCC, konnte aus den Daten dieser Arbeit kein Zusammenhang zwischen einer CMTM6-Expression und dem p21-Status der untersuchten Tumorproben festgestellt werden (Huang et al., 2022).

Unter Berücksichtigung dieser Ergebnisse lässt sich ableiten, dass sich das TME im HNSCC aufgrund der synergistischen Aktivität von CMTM6 und PD-L1 positiv beeinflussen lässt. Dies wiederum führt zu einem verbesserten Ansprechen auf die zurzeit zur Verfügung stehenden Therapieoptionen. Aufgrund der Daten dieser Arbeit kann geschlussfolgert werden, dass CMTM6 neben PD-L1 zu einem weiteren Biomarker mit gutem prognostischem und prädikativem Wert im HNSCC gezählt werden sollte.

Zusammenfassung

Das HNSCC zählt zu den sechst häufigsten Tumorentitäten weltweit. Aktuell gültige Therapiestrategien umfassen die radikale chirurgische Intervention, die RCT und Immuntherapie (ICI). Das Ansprechen auf die Therapie sowie das Überleben ist maßgeblich durch das TME beeinflusst. So werden durch die Aktivierung unterschiedlicher Moleküle und Signalkaskaden die tumorinduzierte Immunevasion gefördert und somit die Tumorzellproliferation und das Zellüberleben gesichert. Der PD-L1-CPS ist derzeit alleiniger prädiktiver Biomarker für das Ansprechen auf eine ICI-Therapie. CMTM6 gilt als Stabilisator für PD-L1 und verbessert somit den Therapieerfolg einer ICI in verschiedenen Tumorentitäten. Im HNSCC steht CMTM6 im Zusammenhang mit Cisplatin-Resistenz. Auf Grundlage dieser Beobachtungen untersuchte die vorliegende Arbeit den Einfluss des CMTM6-Status auf das Überleben und das Therapieansprechen von Cisplatin-therapierten HNSCC-Patient:innen.

In dieser Arbeit wurden 151 Tumorproben in einem retrospektiven, Cisplatin-behandelten kaukasischen Kollektiv untersucht. Die immunhistochemischen Analysen wurden mit einem TMA durchgeführt. Der CMTM6-CPS wurde mittels IHC am Tumor und den tumor-assoziierten Immunzellen erhoben. Neben dem CMTM6-Status wurden die Tumorproben hinsichtlich ihres PD-L1-, p53-, p21-, AKT- und pAKT-Status analysiert. Die klinischen Parameter wie die Wahl der Behandlung, das progressionsfreie Überleben und das Gesamtüberleben wurden aus der innerklinischen Datenbank entnommen.

Die Ergebnisse der Analyse zeigten, dass ein CMTM6-CPS ≥ 10 mit einem positiven PD-L1-Status (≥ 1) ($r = 0,26$; $p = 0,001$), AKT ($r = 0,244$; $p = 0,01$) und pAKT ($r = 0,22$; $p = 0,01$) korreliert, jedoch nicht mit p21. Weitere Korrelationen ließen sich zwischen AKT und pAKT ($r = 0,262$; $p = 0,007$) nachweisen. Patient:innen mit einem CMTM6-CPS ≥ 10 sowie Patient:innen mit positiven PD-L1-Status zeigten ein verlängertes OS und PFS. Die Subgruppe der Cisplatin-therapierten Patient:innen wiesen bei vermehrter CMTM6-Expression und positivem PD-L1-Status ein verlängertes OS und PFS auf.

Anhand dieser Ergebnisse ist eine vermehrte Expression von CMTM6 als prognostisch und prädiktiv günstiger Biomarker zu bewerten. Der PD-L1 stabilisierende Effekt von CMTM6 und der Einfluss auf AKT sowie nachgeschaltete Signalachsen, beeinflussen den Tumor sowie das umgebende TME positiv hinsichtlich eines Therapieansprechens. In weiteren Untersuchungen sollte der Effekt von CMTM6 auf das Ansprechen auf eine ICI-Therapie überprüft werden, sowie der molekulare Zusammenhang zwischen CMTM6 und den Tumorzellen.

Thesen

1. Nicht-kutane- Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals Bereiches (HNSCC) zählen zu den sechst häufigsten malignen Neoplasien. Die weltweite Inzidenz umfasst 860.000 Fälle pro Jahr. Die primäre Manifestation umfasst die anatomischen Regionen der Mundhöhle, Rachen, Speicheldrüsen, Larynx und Lippen.
2. Das HNSCC lässt sich anhand seiner Ätiologie in noxen- und virusassoziierte Malignome klassifizieren. Dabei sind Rauchen und Alkohol bei der Entstehung von noxen-assoziierten Neoplasien die Hauptrisikofaktoren. Virus- assoziierte Neoplasien hingegen weisen meist eine vorangegangene Infektion mit den potentiell onkogenen Humanen- Papilloma-Virus (HPV) und Eppstein-Barr-Virus (EBV) auf.
3. Die anatomische Region der Neoplasie lässt Rückschlüsse auf die zugrundeliegende Ätiologie zu. Noxen-assoziierte Karzinome befinden sich vorwiegend im Bereich der Mundhöhle, des Hypopharynx und Larynx wohingegen virus- assoziierte sich vorrangig im Oropharynx manifestieren.
4. CMTM6 nimmt mit seiner stabilisierenden Wirkung auf PDL-1 Einfluss auf das Ansprechen einer Immuntherapie. Dabei spielen PDL-1- Inhibitoren wie Nivolumab und Pembrolizumab eine entscheidende Rolle um der tumorinduzierten Immunevasion entgegen zu wirken.
5. CMTM6 beeinflusst durch verschiedene Mechanismen die Tumormikroumgebung und nimmt damit Einfluss auf das Tumorzellüberleben und mögliche Chemotherapieresistenzen. In dieser Arbeit werden ausgewählte Signalkaskaden, welche möglicherweise ausschlaggebend für diese Phänomene sind.
6. Das Outcome der Patienten mit vermehrter CMTM6- Expression fällt abhängig der Tumorentität sehr unterschiedlich aus. Daraus ableitend wird in dieser Arbeit der prognostische Wert von CMTM6 im HNSCC in Abhängigkeit von klinisch-pathologischen Gesichtspunkten überprüft und seine prädiktive Funktion für das Ansprechen auf eine radio-chemo Therapie (RCT) evaluiert.

7. Hohe Expression von CMTM6 bei der in dieser Arbeit untersuchten Kohorte korrelieren mit einem verlängerten progressionsfreiem- und Gesamtüberleben sowohl im Gesamtkollektiv sowie in der cisplatin-therapierten Subgruppe. Schlussfolgernd daraus ist CMTM6 im HNSCC als prädiktiver und prognostischer Biomarker anzusehen und steht im kaukasischem Kollektiv einer platin-Resistenz entgegen.
8. Korrelationen zwischen CMTM6 und PDL-1 zeigen eine synergistische hohe Expression. PDL-1 gilt bereits als etablierter prognostischer Biomarker für das Ansprechen einer Immuntherapie. In den Subgruppen mit hoher PDL-1 und CMTM6 Expression konnten ein verlängertes progressionsfreie- und Gesamtüberleben gezeigt werden. Somit ist CMTM6 als ergänzender prognostischer und prädiktiver Biomarker anzusehen.

Literaturverzeichnis

- Ambrosini-Spaltro, A., Limarzi, F., Gaudio, M., Calpona, S., & Meccariello, G. (2022). PD-L1 expression in head and neck carcinoma by combined positive score: a comparison among preoperative biopsy, tumor resection, and lymph node metastasis. *Virchows Archiv*, 481(1), 93–99. <https://doi.org/10.1007/s00428-022-03322-7>
- Amin, M. B., Frederick, J., Greene, L., Edge, S. B., Compton, C. C., Gershenwald, J. E., Brookland, R. K., Meyer, L., Gress, D. M., David, P., Byrd, R., & Winchester, P. (n.d.). *The Eighth Edition AJCC Cancer Staging Manual: Continuing to Build a Bridge From a Population-Based to a More “Personalized” Approach to Cancer Staging*. <https://doi.org/10.3322/caac.21388>
- Baba, R. H. A., Weichert, E. W., Ihrler, S., Boxberg, M., Agaimy, A., Mollenhauer, M., & Hartmann, A. (2018). Schwerpunkt: Kopf-Hals-Tumoren Morphologie des nicht-kutanen Plattenepithelkarzinoms im Kopf-Hals-Bereich. *Der Pathologe*. <https://doi.org/10.1007/s00292-017-0395-5>
- Becker, A.-S., Wieder, N., Zonnur, S., Zimpfer, A., Krause, M., Schneider, B., Strüder, D. F., Burmeister, A.-S., Erbersdobler, A., Junghanss, C., & Maletzki, C. (2024). CMTM6 status predicts survival in head and neck squamous cell carcinoma and correlates with PD-L1 expression. *Discover Oncology*, 15(1), 745. <https://doi.org/10.1007/s12672-024-01554-4>
- Bertoli, C., Skotheim, J. M., & de Bruin, R. A. M. (2013). Control of cell cycle transcription during G1 and S phases. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 14(8), 518–528. <https://doi.org/10.1038/nrm3629>
- Bhatia, A., & Burtneß, B. (2023). Treating Head and Neck Cancer in the Age of Immunotherapy: A 2023 Update. *Drugs*, 83(3), 217–248. <https://doi.org/10.1007/s40265-023-01835-2>
- Bouزيد, A., Al Ani, M., de la Fuente, D., Al Shareef, Z. M., Quadri, A., Hamoudi, R., & Al-Rawi, N. (2023). Identification of p53-target genes in human papillomavirus-associated head and neck cancer by integrative bioinformatics analysis. *Frontiers in Oncology*, 13. <https://doi.org/10.3389/FONC.2023.1128753/FULL>
- Bray, F., Laversanne, M., Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Soerjomataram, I., & Jemal, A. (2024). Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 74(3), 229–263. <https://doi.org/10.3322/caac.21834>
- Brolhi, S., Parks, S. K., Vial, V., Durivault, J., Mostosi, L., Pouysségur, J., Pagès, G., & Picco, V. (2018). AKT1 restricts the invasive capacity of head and neck carcinoma cells harboring a constitutively active PI3 kinase activity. *BMC Cancer*, 18(1). <https://doi.org/10.1186/S12885-018-4169-0>
- Brooks, P. J., & Theruvathu, J. A. (2005). DNA adducts from acetaldehyde: implications for alcohol-related carcinogenesis. *Alcohol*, 35(3), 187–193. <https://doi.org/10.1016/j.alcohol.2005.03.009>

- Cardone, M. H., Roy, N., Stennicke, H. R., Salvesen, G. S., Franke, T. F., Stanbridge, E., Frisch, S., & Reed, J. C. (1998). Regulation of Cell Death Protease Caspase-9 by Phosphorylation. *Science*, 282(5392), 1318–1321. <https://doi.org/10.1126/science.282.5392.1318>
- Chen, J. M., Rosal, R., Smith, S., Pincus, M. R., & Brandt-Rauf, P. W. (2001). Common Conformational Effects of p53 Mutations. *Journal of Protein Chemistry*, 20(2), 101–105. <https://doi.org/10.1023/A:1011065022283>
- Chen, L., Yang, Q. C., Li, Y. C., Yang, L. L., Liu, J. F., Li, H., Xiao, Y., Bu, L. L., Zhang, W. F., & Sun, Z. J. (2020). Targeting CMTM6 Suppresses Stem Cell-Like Properties and Enhances Antitumor Immunity in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Cancer Immunology Research*, 8(2), 179–191. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-19-0394>
- Chen, Z., John, J., & Wang, J. H. (2022). Why responses to immune checkpoint inhibitors are heterogeneous in head and neck cancers: Contributions from tumor-intrinsic and host-intrinsic factors. *Frontiers in Oncology*, 12, 995434. <https://doi.org/10.3389/FONC.2022.995434>
- Cohen, E. E. W., Bell, R. B., Bifulco, C. B., Burtneess, B., Gillison, M. L., Harrington, K. J., Le, Q. T., Lee, N. Y., Leidner, R., Lewis, R. L., Licitra, L., Mehanna, H., Mell, L. K., Raben, A., Sikora, A. G., Uppaluri, R., Whitworth, F., Zandberg, D. P., & Ferris, R. L. (2019). The Society for Immunotherapy of Cancer consensus statement on immunotherapy for the treatment of squamous cell carcinoma of the head and neck (HNSCC). *Journal for Immunotherapy of Cancer*, 7(1), 184. <https://doi.org/10.1186/S40425-019-0662-5>
- D’Amico, F., Skarmoutsou, E., & Stivala, F. (2009). State of the art in antigen retrieval for immunohistochemistry. *Journal of Immunological Methods*, 341(1–2), 1–18. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2008.11.007>
- Datta, S. R., Dudek, H., Tao, X., Masters, S., Fu, H., Gotoh, Y., & Greenberg, M. E. (1997). Akt Phosphorylation of BAD Couples Survival Signals to the Cell-Intrinsic Death Machinery. *Cell*, 91(2), 231–241. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80405-5](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80405-5)
- Dayyani, F., Etzel, C. J., Liu, M., Ho, C. H., Lippman, S. M., & Tsao, A. S. (2010). Meta-analysis of the impact of human papillomavirus (HPV) on cancer risk and overall survival in head and neck squamous cell carcinomas (HNSCC). *Head & Neck Oncology*, 2(1). <https://doi.org/10.1186/1758-3284-2-15>
- de Bakker, T., Journe, F., Descamps, G., Saussez, S., Dragan, T., Ghanem, G., Krayem, M., & Van Gestel, D. (2022). Restoring p53 Function in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma to Improve Treatments. *Frontiers in Oncology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.799993>
- Diehl, J. A., Cheng, M., Roussel, M. F., & Sherr, C. J. (1998). Glycogen synthase kinase-3 β regulates cyclin D1 proteolysis and subcellular localization. *Genes & Development*, 12(22), 3499–3511. <https://doi.org/10.1101/gad.12.22.3499>
- Dimri, G. P., Nakanishi, M., Desprez, P.-Y., Smith, J. R., & Campisi, J. (1996). Inhibition of E2F Activity by the Cyclin-Dependent Protein Kinase Inhibitor p21 in Cells Expressing or Lacking

- a Functional Retinoblastoma Protein. *Molecular and Cellular Biology*, 16(6), 2987–2997. <https://doi.org/10.1128/MCB.16.6.2987>
- Evrard, D., Hourseau, M., Couvelard, A., Paradis, V., Gauthier, H., Raymond, E., Halimi, C., Barry, B., & Faivre, S. (2020). PD-L1 expression in the microenvironment and the response to checkpoint inhibitors in head and neck squamous cell carcinoma. *OncolImmunology*, 9(1). <https://doi.org/10.1080/2162402X.2020.1844403>
- Fasano, M., Della Corte, C. M., Viscardi, G., Di Liello, R., Paragliola, F., Sparano, F., Iacovino, M. L., Castrichino, A., Doria, F., Sica, A., Morgillo, F., Colella, G., Tartaro, G., Cappabianca, S., Testa, D., Motta, G., & Ciardiello, F. (2021). Head and neck cancer: the role of anti-EGFR agents in the era of immunotherapy. *Therapeutic Advances in Medical Oncology*, 13, 175883592094941. <https://doi.org/10.1177/1758835920949418>
- Garolla, A., Graziani, A., Grande, G., Ortolani, C., & Ferlin, A. (2023). HPV-related diseases in male patients: an underestimated conundrum. *Journal of Endocrinological Investigation*, 47(2), 261–274. <https://doi.org/10.1007/s40618-023-02192-3>
- Ghosh, S., Shah, P. A., & Johnson, F. M. (2022). Novel Systemic Treatment Modalities Including Immunotherapy and Molecular Targeted Therapy for Recurrent and Metastatic Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(14), 7889. <https://doi.org/10.3390/ijms23147889>
- Hajian-Tilaki, K. (2013). Receiver Operating Characteristic (ROC) Curve Analysis for Medical Diagnostic Test Evaluation. *Caspian Journal of Internal Medicine*, 4(2), 627–635.
- Han, Y., Liu, D., & Li, L. (2020). PD-1/PD-L1 pathway: current researches in cancer. *American Journal of Cancer Research*, 10(3), 727. /pmc/articles/PMC7136921/
- Haragan, A., Liebler, D. C., Das, D. M., Soper, M. D., Morrison, R. D., Slebos, R. J. C., Ackermann, B. L., Fill, J. A., Schade, A. E., Gosney, J. R., & Gruver, A. M. (2020). Accelerated instability testing reveals quantitative mass spectrometry overcomes specimen storage limitations associated with PD-L1 immunohistochemistry. *Laboratory Investigation*, 100(6), 874–886. <https://doi.org/10.1038/s41374-019-0366-y>
- Hashibe, M., Brennan, P., Benhamou, S., Castellsague, X., Chen, C., Curado, M. P., Maso, L. D., Daudt, A. W., Fabianova, E., Wunsch-Filho, V., Franceschi, S., Hayes, R. B., Herrero, R., Koifman, S., La Vecchia, C., Lazarus, P., Levi, F., Mates, D., Matos, E., ... Boffetta, P. (2007). Alcohol Drinking in Never Users of Tobacco, Cigarette Smoking in Never Drinkers, and the Risk of Head and Neck Cancer: Pooled Analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology Consortium. *JNCI Journal of the National Cancer Institute*, 99(10), 777–789. <https://doi.org/10.1093/jnci/djk179>
- Hecht, S. S. (1999). Tobacco Smoke Carcinogens and Lung Cancer. *JNCI Journal of the National Cancer Institute*, 91(14), 1194–1210. <https://doi.org/10.1093/jnci/91.14.1194>
- Hondelink, L. M., Hüyük, M., Postmus, P. E., Smit, V. T. H. B. M., Blom, S., von der Thüsen, J. H., & Cohen, D. (2022). Development and validation of a supervised deep learning algorithm for automated whole-slide programmed death-ligand 1 tumour proportion score

- assessment in non-small cell lung cancer. *Histopathology*, 80(4), 635–647. <https://doi.org/10.1111/HIS.14571>
- Hou, X., He, S., Zhang, D., Yang, C., Shi, Y., & Zhang, K. (2020). Expression and Clinical Significance of CMTM6 in Nonsmall Cell Lung Cancer. *DNA and Cell Biology*, 39(12), 2265–2271. <https://doi.org/10.1089/dna.2020.5564>
- Huang, Y., Zhu, Y., Yang, J., Pan, Q., Zhao, J., Song, M., Yang, C., Han, Y., Tang, Y., Wang, Q., He, J., Li, Y., He, J., Chen, H., Weng, D., Xiang, T., & Xia, J. C. (2022). CMTM6 inhibits tumor growth and reverses chemoresistance by preventing ubiquitination of p21 in hepatocellular carcinoma. *Cell Death & Disease*, 13(3), 251. <https://doi.org/10.1038/s41419-022-04676-1>
- Hussaini, H. M., Seo, B., & Rich, A. M. (2023). *Immunohistochemistry and Immunofluorescence* (pp. 439–450). https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2780-8_26
- Hyodo, T., Kuribayashi, N., Fukumoto, C., Komiyama, Y., Shiraishi, R., Kamimura, R., Sawatani, Y., Yaguchi, E., Hasegawa, T., Izumi, S., Wakui, T., Nakashiro, K., Uchida, D., & Kawamata, H. (2022). The mutational spectrum in whole exon of p53 in oral squamous cell carcinoma and its clinical implications. *Scientific Reports*, 12(1), 21695. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-25744-8>
- Hyuna Sung, P., Jacques Ferlay, Ms. M., Rebecca L. Siegel, M., Mathieu Laversanne, Ms., Isabelle Soerjomataram, M. Ms. P., Ahmedin Jemal, D. P., & Freddie Bray, Bs. Ms. P. (2021). *Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries*. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>
- Johnson, D. E., Burtneß, B., Leemans, C. R., Lui, V. W. Y., Bauman, J. E., & Grandis, J. R. (2020). Head and neck squamous cell carcinoma. *Nature Reviews. Disease Primers*, 6(1), 92. <https://doi.org/10.1038/S41572-020-00224-3>
- Jouhi, L., Hagström, J., Atula, T., & Mäkitie, A. (2017). Is p16 an adequate surrogate for human papillomavirus status determination? *Current Opinion in Otolaryngology & Head & Neck Surgery*, 25(2), 108–112. <https://doi.org/10.1097/MOO.0000000000000341>
- Jung, Y.-S., Qian, Y., & Chen, X. (2010a). Examination of the expanding pathways for the regulation of p21 expression and activity. *Cellular Signalling*, 22(7), 1003–1012. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2010.01.013>
- Jung, Y.-S., Qian, Y., & Chen, X. (2010b). Examination of the expanding pathways for the regulation of p21 expression and activity. *Cellular Signalling*, 22(7), 1003–1012. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2010.01.013>
- Karimian, A., Ahmadi, Y., & Yousefi, B. (2016). Multiple functions of p21 in cell cycle, apoptosis and transcriptional regulation after DNA damage. *DNA Repair*, 42, 63–71. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2016.04.008>
- Karlsson, C., & Karlsson, M. G. (2011). Effects of Long-Term Storage on the Detection of Proteins, DNA, and mRNA in Tissue Microarray Slides. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 59(12), 1113–1121. <https://doi.org/10.1369/0022155411423779>

- Kaur, A., Kuchta, K., Watkin, W., Sullivan, M., Liu, L., Jamshidi, P., Campbell, N., Brockstein, B., & Paintal, A. (2023). Programmed Death Ligand-1 Combined Positive Score Concordance and Interrater Reliability in Primary Tumors and Synchronous Lymph Node Metastases in Resected Cases of p16+ Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, 147(4), 442–450. <https://doi.org/10.5858/arpa.2021-0464-OA>
- Kitamura, N., Sento, S., Yoshizawa, Y., Sasabe, E., Kudo, Y., & Yamamoto, T. (2021). Current trends and future prospects of molecular targeted therapy in head and neck squamous cell carcinoma. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(1), 1–13. <https://doi.org/10.3390/IJMS22010240>
- Li, J. Z., Gao, W., Chan, J. Y.-W., Ho, W.-K., & Wong, T.-S. (2012). Hypoxia in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *ISRN Otolaryngology*, 2012, 1–8. <https://doi.org/10.5402/2012/708974>
- Liu, Z., Williams, M., Stewart, J., Glisson, B. S., Fuller, C., & Roy-Chowdhuri, S. (2022). Evaluation of programmed death ligand 1 expression in cytology to determine eligibility for immune checkpoint inhibitor therapy in patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Cytopathology*, 130(2), 110–119. <https://doi.org/10.1002/cncy.22501>
- Long, Y., Chen, R., Yu, X., Tong, Y., Peng, X., Li, F., Hu, C., Sun, J., & Gong, L. (2023). Suppression of Tumor or Host Intrinsic CMTM6 Drives Antitumor Cytotoxicity in a PD-L1–Independent Manner. *Cancer Immunology Research*, 11(2), 241–260. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-22-0439>
- Loyo, M., Li, R. J., Bettegowda, C., Pickering, C. R., Frederick, M. J., Myers, J. N., & Agrawal, N. (2013). Lessons learned from next-generation sequencing in head and neck cancer. *Head & Neck*, 35(3), 454–463. <https://doi.org/10.1002/hed.23100>
- Luo, J., Manning, B. D., & Cantley, L. C. (2003). Targeting the PI3K-Akt pathway in human cancer: Rationale and promise. *Cancer Cell*, 4(4), 257–262. [https://doi.org/10.1016/S1535-6108\(03\)00248-4](https://doi.org/10.1016/S1535-6108(03)00248-4)
- Machiels, J. P., René Leemans, C., Golusinski, W., Grau, C., Licitra, L., & Gregoire, V. (2020). Squamous cell carcinoma of the oral cavity, larynx, oropharynx and hypopharynx: EHNS–ESMO–ESTRO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up†. *Annals of Oncology*, 31(11), 1462–1475. <https://doi.org/10.1016/j.annonc.2020.07.011>
- Marquard, F. E., & Jücker, M. (2020). PI3K/AKT/mTOR signaling as a molecular target in head and neck cancer. *Biochemical Pharmacology*, 172, 113729. <https://doi.org/10.1016/J.BCP.2019.113729>
- Michaud, D. S., Langevin, S. M., Eliot, M., Nelson, H. H., Pawlita, M., McClean, M. D., & Kelsey, K. T. (2014). High-risk HPV types and head and neck cancer. *International Journal of Cancer*, 135(7), 1653–1661. <https://doi.org/10.1002/ijc.28811>
- Mohapatra, P., Mohanty, S., Ansari, S. A., Shriwas, O., Ghosh, A., Rath, R., Das Majumdar, S. K., Swain, R. K., Raghav, S. K., & Dash, R. (2022). CMTM6 mediates cisplatin resistance in OSCC by regulating AKT/c-MYC driven ribosome biogenesis. <https://doi.org/10.1101/2022.04.08.487634>

- Mohapatra, P., Shriwas, O., Mohanty, S., Ghosh, A., Smita, S., Kaushik, S. R., Arya, R., Rath, R., Das Majumdar, S. K., Muduly, D. K., Raghav, S. K., Nanda, R. K., & Dash, R. (2021). CMTM6 drives cisplatin resistance by regulating Wnt signaling through the ENO-1/AKT/GSK3 β axis. *JCI Insight*, 6(4). <https://doi.org/10.1172/JCI.INSIGHT.143643>
- Molijn, A., Kleter, B., Quint, W., & Doorn, L.-J. van. (2005). Molecular diagnosis of human papillomavirus (HPV) infections. *Journal of Clinical Virology*, 32, 43–51. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2004.12.004>
- Osakabe, M., Yamada, N., Sugimoto, R., Uesugi, N., Nakao, E., Honda, M., Yanagawa, N., & Sugai, T. (2024). The pattern-based interpretation of p53 immunohistochemical expression as a surrogate marker for TP53 mutations in colorectal cancer. *Virchows Archiv*, 1–9. <https://doi.org/10.1007/S00428-024-03790-Z/TABLES/2>
- Peng, Q.-H., Wang, C.-H., Chen, H.-M., Zhang, R.-X., Pan, Z.-Z., Lu, Z.-H., Wang, G.-Y., Yue, X., Huang, W., & Liu, R.-Y. (2021). CMTM6 and PD-L1 coexpression is associated with an active immune microenvironment and a favorable prognosis in colorectal cancer. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*, 9(2), e001638. <https://doi.org/10.1136/jitc-2020-001638>
- Pignon, J.-P., Maître, A. le, Maillard, E., & Bourhis, J. (2009). Meta-analysis of chemotherapy in head and neck cancer (MACH-NC): An update on 93 randomised trials and 17,346 patients. *Radiotherapy and Oncology*, 92(1), 4–14. <https://doi.org/10.1016/j.radonc.2009.04.014>
- Puladi, B., Ooms, M., Kintsler, S., Houschyar, K. S., Steib, F., Modabber, A., Hölzle, F., Knüchel-clarke, R., & Braunschweig, T. (2021). Automated PD-L1 Scoring Using Artificial Intelligence in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Cancers*, 13(17). <https://doi.org/10.3390/CANCERS13174409>
- Rampias, T., Sasaki, C., & Psyrri, A. (2014). Molecular mechanisms of HPV induced carcinogenesis in head and neck. *Oral Oncology*, 50(5), 356–363. <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2013.07.011>
- Rayess, H., Wang, M. B., & Srivatsan, E. S. (2012). Cellular senescence and tumor suppressor gene p16. *International Journal of Cancer*, 130(8), 1715–1725. <https://doi.org/10.1002/ijc.27316>
- Remmele, W., & Stegner, H. E. (1987). [Recommendation for uniform definition of an immunoreactive score (IRS) for immunohistochemical estrogen receptor detection (ER-ICA) in breast cancer tissue]. *Der Pathologe*, 8(3), 138–140. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3303008/>
- Rki. (2017). *Krebs in Deutschland für 2017/2018*. www.krebsdaten.de/krebs-gesamt
- Roninson, I. B. (2002). Oncogenic functions of tumour suppressor p21Waf1/Cip1/Sdi1: association with cell senescence and tumour-promoting activities of stromal fibroblasts. *Cancer Letters*, 179(1), 1–14. [https://doi.org/10.1016/S0304-3835\(01\)00847-3](https://doi.org/10.1016/S0304-3835(01)00847-3)
- Scheid, M. P., & Woodgett, J. R. (2003). Unravelling the activation mechanisms of protein kinase B/Akt. *FEBS Letters*, 546(1), 108–112. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(03\)00562-3](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(03)00562-3)

- Shaha, A., Wang, Y., Wang, X., Wang, D., Guinovart, D., Liu, B., & Kang, N. (2024). CMTM6 mediates the Warburg effect and promotes the liver metastasis of colorectal cancer. *Experimental & Molecular Medicine*, 56(9), 2002–2015. <https://doi.org/10.1038/s12276-024-01303-1>
- SHIOZAKI, A., NAKASHIMA, S., ICHIKAWA, D., FUJIWARA, H., KONISHI, H., KOMATSU, S., KUBOTA, T., OKAMOTO, K., IITAKA, D., SHIMIZU, H., NAKO, Y., TAKEMOTO, K., KISHIMOTO, M., & OTSUJI, E. (2013). Prognostic Significance of p21 Expression in Patients with Esophageal Squamous Cell Carcinoma. *Anticancer Research*, 33(10), 4329. <http://ar.iiarjournals.org/content/33/10/4329.abstract>
- Simon, R., Mirlacher, M., & Sauter, G. (2010). Immunohistochemical analysis of tissue microarrays. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 664, 113–126. https://doi.org/10.1007/978-1-60761-806-5_12
- Starska-Kowarska, K. (2023). The Role of Different Immunocompetent Cell Populations in the Pathogenesis of Head and Neck Cancer—Regulatory Mechanisms of Pro- and Anti-Cancer Activity and Their Impact on Immunotherapy. *Cancers*, 15(6), 1642. <https://doi.org/10.3390/cancers15061642>
- Stenzinger, A., Kriegsmann, · M, Kraywinkel, · K, & Weichert, · W. (2014). Pathologie der malignen Kopf-Hals-Tumoren. *Onkologe*, 20, 116–129. <https://doi.org/10.1007/s00761-013-2584-z>
- Sullivan, K. D., Galbraith, M. D., Andrysiak, Z., & Espinosa, J. M. (2018). Mechanisms of transcriptional regulation by p53. *Cell Death & Differentiation*, 25(1), 133–143. <https://doi.org/10.1038/cdd.2017.174>
- Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (2021). Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 71(3), 209–249. <https://doi.org/10.3322/CAAC.21660>
- The Cancer Genome Atlas Network. (2015). Comprehensive genomic characterization of head and neck squamous cell carcinomas. *Nature*, 517(7536), 576–582. <https://doi.org/10.1038/nature14129>
- THE HUMAN PROTEIN ATLAS. (n.d.). *HEAD AND NECK CANCER - Interactive survival scatter plots & Survival analysis*. Retrieved March 19, 2024, from <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000091317-CMT>
- TNM Classification of Malignant Tumours / UICC*. (n.d.). Retrieved May 2, 2023, from <https://www.uicc.org/what-we-do/sharing-knowledge/tnm#>
- Tzankov, A., Zimpfer, A., Pehrs, A.-C., Lugli, A., Went, P., Maurer, R., Pileri, S., & Dirnhofer, S. (2003). Expression of B-Cell Markers in Classical Hodgkin Lymphoma: A Tissue Microarray Analysis of 330 Cases. *Modern Pathology*, 16(11), 1141–1147. <https://doi.org/10.1097/01.MP.0000093627.51090.3F>

- Vivanco, I., & Sawyers, C. L. (2002). The phosphatidylinositol 3-Kinase–AKT pathway in human cancer. *Nature Reviews Cancer*, 2(7), 489–501. <https://doi.org/10.1038/nrc839>
- Völzke, H., Ittermann, T., Schmidt, C. O., Baumeister, S. E., Schipf, S., Alte, D., Biffar, R., John, U., & Hoffmann, W. (2015). Prevalence Trends in Lifestyle-Related Risk Factors. *Deutsches Ärzteblatt International*. <https://doi.org/10.3238/arztebl.2015.0185>
- Weichert, W., Ihrler, S., Boxberg, M., Agaimy, A., Mollenhauer, M., & Hartmann, A. (2018). Morphologie des nicht-kutanen Plattenepithelkarzinoms im Kopf-Hals-Bereich. *Pathologe*, 39(1), 3–10. <https://doi.org/10.1007/S00292-017-0395-5/FIGURES/3>
- WHO. (2022, February). *Cancer*. https://www.who.int/health-topics/cancer#tab=tab_1
- Wittekind, C. (2017). *TNM Klassifikation maligner Tumoren* (Wiley-VCH, Weinheim).
- Wolff. (2021). *S3-Leitlinie Diagnostik und Therapie des Mundhöhlenkarzinoms*.
- Wuerdemann, N., Gültekin, S. E., Pütz, K., Wittekindt, C., Huebbers, C. U., Sharma, S. J., Eckel, H., Schubotz, A. B., Gattenlöhner, S., Büttner, R., Speel, E.-J., Klussmann, J. P., Wagner, S., & Quaas, A. (2020). PD-L1 Expression and a High Tumor Infiltrate of CD8+ Lymphocytes Predict Outcome in Patients with Oropharyngeal Squamous Cells Carcinoma. *Int. J. Mol. Sci*, 2020, 5228. <https://doi.org/10.3390/ijms21155228>
- Xie, Y., Shi, X., Sheng, K., Han, G., Li, W., Zhao, Q., Jiang, B., Feng, J., Li, J., & Gu, Y. (2018). PI3K/Akt signaling transduction pathway, erythropoiesis and glycolysis in hypoxia (Review). *Molecular Medicine Reports*. <https://doi.org/10.3892/mmr.2018.9713>
- Xie, Y., Shi, X., Sheng, K., Han, G., Li, W., Zhao, Q., Jiang, B., Feng, J., Li, J., & Gu, Y. (2019). PI3K/Akt signaling transduction pathway, erythropoiesis and glycolysis in hypoxia. *Molecular Medicine Reports*, 19(2), 783. <https://doi.org/10.3892/MMR.2018.9713>
- Yong Liao¹ and Mien-Chie Hung². (2010). Physiological regulation of Akt activity and stability. *Am J Transl Res*.
- Zander, H., Müller-Egert, S., Zwiewka, M., Groß, S., van Zandbergen, G., & Engelbergs, J. (2020). Checkpointinhibitoren in der Tumorthherapie. *Bundesgesundheitsblatt, Gesundheitsforschung, Gesundheitsschutz*, 63(11), 1322. <https://doi.org/10.1007/S00103-020-03221-9>
- Zeiger, J., Finger, J. D., Kuntz, B., Hoebel, J., Lampert, T., & Starker, A. (2018). Zeitliche Trends beim Rauchverhalten Erwachsener in Deutschland. *Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz*, 61(11), 1365–1376. <https://doi.org/10.1007/s00103-018-2817-9>
- Zhang, T., Yu, H., Dai, X., & Zhang, X. (2022). CMTM6 and CMTM4 as two novel regulators of PD-L1 modulate the tumor microenvironment. *Frontiers in Immunology*, 13. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2022.971428>

- Zhao, Y., Zhang, M., Pu, H., Guo, S., Zhang, S., & Wang, Y. (2021). Prognostic Implications of Pan-Cancer CMTM6 Expression and Its Relationship with the Immune Microenvironment. *Frontiers in Oncology*, 10. <https://doi.org/10.3389/FONC.2020.585961/FULL>
- Zhou, B. P., Liao, Y., Xia, W., Spohn, B., Lee, M.-H., & Hung, M.-C. (2001). Cytoplasmic localization of p21Cip1/WAF1 by Akt-induced phosphorylation in HER-2/neu-overexpressing cells. *Nature Cell Biology*, 3(3), 245–252. <https://doi.org/10.1038/35060032>
- Zugazagoitia, J., Liu, Y., Toki, M., McGuire, J., Ahmed, F. S., Henick, B. S., Gupta, R., Gettinger, S. N., Herbst, R. S., Schalper, K. A., & Rimm, D. L. (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. *Journal of Thoracic Oncology : Official Publication of the International Association for the Study of Lung Cancer*, 14(12), 2084. <https://doi.org/10.1016/J.JTHO.2019.09.014>

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich der Vielzahl an Leuten danken, die es mir ermöglicht haben, diese Dissertation erfolgreich fertig zu stellen und zu veröffentlichen.

Zunächst möchte ich Herrn Prof. Dr. med. Ebersdobler, Direktor des Instituts für Pathologie an der Universitätsmedizin Rostock, meinen Dank für die Schaffung optimaler Rahmenbedingungen und die Unterstützung meiner wissenschaftlichen Forschung aussprechen.

Des Weiteren möchte ich Frau PD Dr. med. habil. Annette Zimpfer für die Bereitstellung und Betreuung des Themas danken.

Ein besonderer Dank geht an Frau Dr. med. Anne-Sophie Becke, Oberärztin am Institut für Pathologie der UMR. Ihre fachliche Expertise, ihre außerordentliche Geduld, konstruktiven Anregungen und wertvollen wissenschaftlichen Diskussionen sowie die tatkräftige Unterstützung bei der Umsetzung und Anfertigung dieser wissenschaftlichen Arbeit haben einen entscheidenden Anteil daran, dass diese erfolgreich beendet wurde.

Mein Dank gilt auch allen weiteren Mitgliedern unserer Arbeitsgruppe, die immer konstruktive Anregungen parat hatten.

Auch allen Mitarbeitern des Institutes gilt mein Dank. Durch ihre Hilfestellung konnten erstklassige Daten generiert werden.

Ein weiterer hochachtungsvoller Dank gilt allen Patienten dieses Kollektivs. Ohne ihre Zustimmung zur Teilnahme an Studien und ohne die Bereitstellung ihrer Gewebeproben sowie persönlicher Daten hätte diese Studie nicht stattfinden. In diesem Rahmen gilt der Dank auch Frau Zettel, die jegliche Daten des Krebsregisters Mecklenburg-Vorpommern uns zur Verfügung gestellt hat.

Zuletzt möchte ich meiner Familie und meinen Freunden danken. Ihre unermüdliche Unterstützung und motivierender Einfluss sowie tatkräftige Unterstützung haben mir dazu verholfen diese Arbeit neben dem Studium erfolgreich zu beenden.

Vorträge

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere eidesstattlich durch meine 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 Angabe einer falschen Versicherung die Prüfung als nicht bestanden gelten hat.

Rostock, 01.04.2025
(Abgabedatum)

(Unterschrift)